



NO9800007



NORGE

(12) **UTLEGNINGSSKRIFT**

(19) NO

(11) **180434**

(13) B

(51) Int Cl⁶ A 61 K 51/06

Styret for det industrielle rettsvern

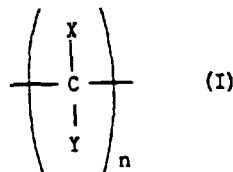
(21) Søknadsnr	903632	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	15.12.89, PCT/US89/05782
(22) Inng. dag	17.08.90	(85) Videreføringsdag	17.08.90
(24) Løpedag	15.12.89	(30) Prioritet	19.12.88, US, 284876
(41) Alm. tilgj.	17.10.90		
(44) Utlegningsdato	13.01.97		

(71) Søker	The Dow Chemical Co, P.O. Box 1967, Midland, MI 48640-1967, US
(72) Oppfinner	Jaime Simon, Angleton, TX, US David Alan Wilson, Richwood, TX, US Joseph R. Garlich, Lake Jackson, TX, US David E. Troutner, Columbia, MO, US
(74) Fullmektig	Johan H. Gørbitz, Bryn & Aarflot AS, 0104 OSLO

(54) **Benevnelse** **Fremgangsmåte for fremstilling av et makrocyklisk aminofosfonsyrekompleks eller et fysiologisk akseptabelt salt derav**

(56) **Anførte publikasjoner** EP A2, A3 164843, US 4187284, US 4017595
Chemical Abstracts 87, 179938h, 1977

(57) **Sammendrag** Partikkel-emitterende radionuklider, f.eks. samarium-153, er blitt kompleksert med visse makrocykliske aminofosfonsyrer hvor nitrogenet og fosfor er forbundet med en alkylengruppe eller substituert alkylengruppe. Det er nå beskrevet et preparat som omfatter et kompleks som har (1) en makrocyklisk aminofosfonsyre som inneholder 1,4,7,10-tetraazacyklododecan som den makrocykliske del, eller et fysiologisk akseptabelt salt derav, hvor nitrogenet og fosfor er forbundet med et alkylen- eller substituert alkylen-radikal med formel (I)



hvor X og Y uavhengig av hverandre er hydrogen, hydroksyl-, karboksyl-, fosfon- eller hydrokarbon-radikaler som har 1-8 karbonatomer og fysiologisk akseptable salter av syre-radikalene; og n er 1-3, med det forbehold at når n > 1, kan hver av X og Y være like eller forskjellige fra tilsvarende X og Y i ethvert annet karbonatom, og (2) minst én radionuklide av Sm-153, Gd-159, Ho-166, Lu-177, Y-90 eller Yb-175.

Foreliggende oppfinnelse angår en fremgangsmåte for fremstilling av makrocykliske aminofosfonsyrekomplekser som er egnet for behandling av cancer, spesielt behandling av forkalkede svulster, og for å lette smerte i ben. Kompleksene omfatter en radionuklide kompleksert med en makrocyklisk aminofosfonsyre som virkestoff.

Utvikling av benmetastaser er en vanlig og ofte katastrofal situasjon for en kreftpasient. Smerten, patologiske frakturer, ofte nevrologiske svakheter og påtvunget immobilitet forårsaket av disse metastatiske lesjoner nedsetter livskvaliteten for kreftpasienten vesentlig. Antallet av pasienter som rammes av metastatisk sykdom er stort, i og med at nesten 50% av alle pasienter som får bryst-, lunge- eller prostatacancer, tilslutt vil utvikle benmetastaser. Benmetastase ses også hos pasienter med cancer i nyre-, skjoldbrusk-, blære-, cervix- og andre svulster, men samlet representerer disse mindre enn 20% av pasienter som utvikler benmetastaser. Metastatisk bencancer er sjeldent livstruende, og i blant lever pasienter i årevis etter oppdagelsen av benlesjonene. I første omgang dreier behandlingen seg om å lette smerte for å redusere behovet for narkotiske medikamenter og tiltagende ambulente behandling. Det er selvsagt et håp at enkelte av krefttilfellene kan helbredes.

Bruken av radionuklider for behandling av cancer med metastaser til ben, går tilbake til begynnelsen av 1950-årene. Det har vært foreslått å injisere en radioaktiv partikkelemitterende nuklide i en egnet form for behandling av forkalkede lesjoner. Det er ønskelig at slike nuklider konsentreres i området for benlesjonen samtidig som minimale mengder når det bløte vev og normalt benvev. Radioaktive fosfor- (P-32 og P-33) forbindelser er foreslått, men de nukleære og biolokalisierende egenskaper begrenser bruken av disse forbindelsene. [Se for eksempel Kaplan, E., et al., Journal of Nuclear Medicine, 1(1), 1 (1960) og US-patent 3.965.254.]

Et annet forsøk på å behandle bencancer er gjort ved å benytte fosforforbindelser inneholdende en bor-rest. Forbindelsene ble injisert i kroppen (intravenøst) og akkumulert i skjelett-systemet. Behandlingsområdet ble deretter bestrålt med nøytroner

for å aktivere bor og gi en terapeutisk bestrålingsdose. (Se US-patent 4.399.817).

Bruk av radionuklider til behandling av forkalkede svulster er omtalt i publisert Europeisk patentsøknad 176.288, hvor bruk av Sm-153, Gd-159, Ho-166, Lu-177 eller Yb-175 kompleksert med visse ligander valgt fra etylendiamintetraeddiksyre (EDTA) eller hydroksyetyletylendiamintrieddiksyre (HEEDTA) beskrives.

Etter de ovennevnte fremgangsmåter er det ikke mulig å gi terapeutiske doser til svulsten uten vesentlig ødeleggelse av normalt vev. I mange tilfeller, spesielt ved metastatiske benlesjoner, har svulsten spredd seg gjennom skjelettsystemet og amputering eller ekstern bestråling lar seg ikke gjennomføre. (Se Seminars in Nuclear Medicine, Vol. IX, Nr. 2, april, 1979).

Bruk av Re-186 kompleksert med et difosfonat er også foreslått. [Mathieu, L. et al., Int. J. Applied Rad. & Isotopes 30, 725-727 (1979); Weinenger, J., Ketring, A. R., et al., Journal of Nuclear Medicine 24(5), 125 (1983)]. Den nødvendige fremstilling og rensing for dette kompleks begrenser imidlertid dets anvendelse og utstrakte bruk.

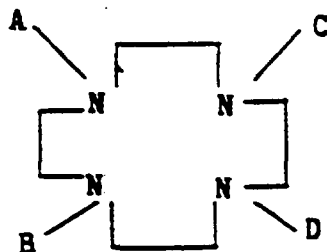
Strontium-89 er også foreslått for pasienter med metastatiske benlesjoner. Den lange halveringstiden (50,4 dager), høye blodnivåer og lave forhold mellom lesjon og normalt ben begrenser bruken. [Se Firusian, N., Mellin, P., Schmidt, C.G., The Journal of Urology 116, 764 (1976); Schmidt, C. G., Firusian, N., Int. J. Clin. Pharmacol. 93, 199-205, (1974)].

En palliativ behandling av benmetastaser er omtalt, som benytter I-131 merket α -amino-(3-jod-4-hydroksybenzyliden)-difosfonat [Eisenhut, M., Journal of Nuclear Medicine 25(12), 1356-1361 (1984)]. Bruken av radioaktivt jod som terapeutisk radionuklide er langt fra ønskelig på grunn av jodets kjente tendens til lokalisering i skjoldbruskkjertelen. Eisenhut oppgir jodid som en av de mulige metabolitter av denne forbindelse.

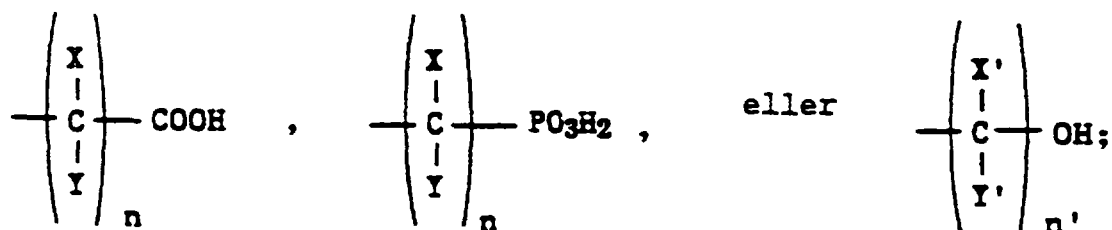
Foreliggende oppfinnelse angår fremstilling av et kompleks som har en radionuklide kompleksert med en makrocyklisk amino-fosfonsyre, så som 1,4,7,10-tetraazacyklododecan-1,4,7,10-tetrametylenfosfonsyre eller deres fysiologisk akseptable salter. Dette kompleks bevirker minimal skade på normalt vev når det gis på

passende måte. Det fremstilte kompleks er mer effektivt ved lavere molart forhold mellom ligand og metall enn hva som tidligere har vært kjent på området.

I henhold til foreliggende oppfinnelse tilveiebringes en fremgangsmåte for fremstilling av et makrocyklisk aminofosfonsyre-kompleks, eller et fysiologisk akseptabelt salt derav, som har en ligand som er en makrocyklisk aminofosfonsyre med strukturen



hvor substituentene A, B, C og D uavhengig av hverandre er hydrogen, hydrokarbonradikaler som har 1-8 karbonatomer eller en del med formel



og fysiologisk akseptable salter av syreradikalene, hvor X og Y uavhengig av hverandre er hydrogen, hydroksyl-, karboksyl-, fosfon- eller hydrokarbonradikaler med 1-8 karbonatomer samt fysiologisk akseptable salter av syreradikalene; og n er 1-3, med det forbehold at når $n > 1$, kan X og Y være like eller forskjellige fra tilsvarende X og Y på et annet karbonatom, X' og Y' uavhengig av hverandre er hydrogen, metyl- eller etylradikaler; n' er 2 eller 3, med det forbehold at minst to av de nevnte nitrogensubstituentene er en fosforholdig gruppe, og minst én radionuklide av Sm-153, Gd-159, Ho-166, Lu-177, Y-90 eller Yb-175.

Fremgangsmåten karakteriseres ved omsetning av liganden med en radionuklide av Sm-153, Gd-159, Ho-166, Lu-177, Y-90 eller Yb-175, med et molart forhold mellom ligand og radio-nuklide på minst 1:1, i vann ved kontrollert pH, og eventuelt dannes et

fysiologisk godtagbart salt derav, og eventuelt til-setning av en farmasøytisk godtagbar bærer.

Den foretrukne makrocykliske aminofosfonsyre er 1,4,7,10-tetraazacyklododecan-1,4,7,10-tetrametylenfosfonsyre (DOTMP).

Preparater inneholdende et kompleks fremstilt ifølge oppfinnelsen kan administreres som en formulering med egnede farmasøytisk akseptable hjelpemidler. Det ifølge foreliggende oppfinnelse fremstilte kompleks kan benyttes i kombinasjon med ett eller flere andre midler, medikamenter, behandlinger og/eller bestrålingskilder som bidrar til terapien ved forkalkede svulster eller til å lette bensmerte.

Enkelte preparater som inneholder disse komplekser har vist seg terapeutisk egnet ved forkalkede svulster i dyr. Administrasjonen av de terapeutiske preparatene kan virke lindrende for dyret, for eksempel ved å lette smerte og/eller hemme svulstvekst og/eller forårsake regresjon av svulster og/eller ødelegge svulstene. Som nærmere beskrevet senere, er egenskapene av radionukliden, av den makrocykliske aminofosfonsyre og av komplekset som dannes av disse, viktige ved bestemmelse av effektiviteten av ethvert spesielt preparat anvendt for slik behandling.

Til et kompleks fremstilt ifølge foreliggende oppfinnelse, som har minst én av radionuklidene kompleksert med minst én av de makrocykliske aminofosfonsyrer definert ovenfor, settes hensiktsmessig et farmasøytisk akseptabelt bæremiddel eller hjelpestoff for dette. Fremgangsmåtene for fremstilling av slike formuleringer er velkjent. Formuleringene er sterile og kan være i form av suspensjoner, injiserbare oppløsninger eller andre egnede farmasøytisk akseptable formuleringer. Farmasøytisk akseptable suspenderingsmidler, med eller uten hjelpestoffer, kan benyttes. De sterile preparatene er egnet for administrasjon til et dyr, hvor preparatet er definert som tidligere og radionukliden foreligger i doseringsform i en mengde på minst 0,02 mCi per kg kroppsvekt, fortrinnsvis minst 0,2 mCi per kg kroppsvekt.

Partikkel-emitterende radionuklider benyttet i kompleksene fremstilt i henhold til oppfinnelsen, er i stand til å avgi en tilstrekkelig høy lokalisert ionisasjonstetthet til å lette smerte

og/eller hemme svulstvekst og/eller forårsake regresjon av svulster, og/eller ødelegge svulsten, og er i stand til å danne komplekser med de makrocykliske aminofosfonsyreligander som her er beskrevet. Radionuklider som har vist seg egnet i praksis er Samarium-153 (Sm-153), Holmium-166 (Ho-166), Ytterbium-175 (Yb-175), Lutetium-177 (Lu-177), Yttrium-90 (Y-90) og Gadolinium-159 (Gd-159).

For enkelthets skyld vil preparater som har et radionuklide-makrocyklisk-aminofosfonsyrekompleks fremstilt i henhold til foreliggende oppfinnelse, her ofte bli omtalt som "radionuklidepreparater" eller "preparater" og det makrocykliske aminofosfonsyrederivat omtalt som "ligand" eller "chelant".

Betegnelsen "dyr" er her benyttet for varmblodige pattedyr, innbefattet mennesket, og er ment å innbefatte dyr som har behov for behandling av forkalkede svulster eller behov for lindring av bensmerter.

Betegnelsen "forkalkede svulster" innbefatter primærtumorer, hvor skjelettsystemet er det første sted som involveres, invaderende svulster hvor primærtumoren invaderer skjelettsystemet eller andre vevssvulster som forkalkes, og metastatisk benkreft hvor neoplasmer spres fra andre primærsteder, f.eks. prostata og bryst, til skjelettsystemet.

Når det gjelder foreliggende oppfinnelse, anses de her fremstilte komplekser og fysiologisk akseptable salter derav, som likeverdige i de terapeutisk virksomme preparatene. Med fysiologisk akseptable salter menes syreaddisjonssalter av de baser som vil danne et salt med minst én sur gruppe på den ligand eller de ligander som benyttes, og ikke vil forårsake betydelige ugunstige fysiologiske virkninger når de gis til et dyr i doseringer som er i overensstemmelse med god farmakologisk praksis. Enkelte eksempler på slik praksis er beskrevet senere. Egnede baser innbefatter for eksempel alkalimetall- og jordalkalimetallhydroksyder, -karbonater og -bikarbonater, så som natriumhydroksyd, kaliumhydroksyd, kalsiumhydroksyd, kaliumkarbonat, natriumbikarbonat, magnesiumkarbonat og lignende, ammoniak, primære, sekundære og tertiære aminer og lignende. Fysiologisk akseptable salter kan fremstilles ved å behandle de ovenfor definerte makrocykliske

aminofosfonsyrer, spesielt de med formel (II), med en passende base.

Formuleringene inneholdende kompleksene fremstilt i henhold til foreliggende oppfinnelse har fast eller flytende form som inneholder den aktive radiokuklide kompleksert med liganden. Disse formuleringene kan være i form av et sett hvor to komponenter blandes et passende tidsrom før bruk. Enten de er blandet på forhånd eller benyttes som et sett, fordrer formuleringene i alminnelighet et farmasøytisk akseptabelt bæremiddel. Av stabilitetshensyn og andre faktorer, dersom formuleringene er kompleksert med radionukliden før avsendelse til den endelige bruker, nedfryses formuleringen som inneholder komplekset og en buffer, i form av et sett, og den dypfryste formulering blir senere opptint før bruk.

Injiserbare preparater kan være i form av en suspensjon eller en oppløsning. Ved fremstillingen av egnede formuleringer er det å bemerke at vannoppløseligheten av saltet i alminnelighet er større enn for den frie syre. I oppløsningsform løses komplekset (eller eventuelt de enkelte komponenter) opp i et farmasøytisk akseptabelt bæremiddel. Slike bæremidler omfatter et egnet oppløsningsmiddel og, om nødvendig, konserveringsmidler så som benzylalkohol, samt buffere. Brukbare oppløsningsmidler innbefatter for eksempel, vann, vandige alkoholer, glykoler og fosfonat- eller karbonat-estere. Slike vandige oppløsninger inneholder ikke over 50 volumprosent av det organiske oppløsningsmiddel.

Injiserbare suspensjoner fordrer et flytende suspenderingsmiddel, med eller uten hjelpestoffer, som bæremiddel. Suspensjonsmediet kan for eksempel være vandig polyvinylpyrrolidon, inerte oljer, så som vegetabiliske oljer eller høyraffinerte mineraloljer, eller vandig karboksymetylcellulose. Egnede fysiologisk akseptable hjelpestoffer kan, dersom det er nødvendig for å holde komplekset i suspensjon, velges blant annet fra fortykningsmidler så som karboksymetylcellulose, polyvinylpyrrolidon, gelatin og alginater. Mange overflateaktive midler er også egnet som suspenderingsmidler som for eksempel lecitin, alkylfenol, polyetylenoksyd-addukter, naftalensulfonater, alkylbensensulfonater og polyoksyetylen-sorbitanestere. Mange stoffer som påvirker hydrofobisiteten,

tettheten og overflatespenningen av det flytende suspensjonsmediet kan i enkelte tilfeller være til hjelp ved fremstilling av injiserbare suspensjoner. For eksempel er silicon-antiskum, sorbitol og sukkerer nyttige suspenderingsmidler.

Komplekser fremstilt i henhold til foreliggende oppfinnelse som benyttes i preparatene eller formuleringene, må i størst mulig utstrekning oppfylle visse kriterier som angitt nedenfor.

Et kriterium angår valget av radionukliden. Selv om radionuklidens egenskaper er viktige, er de samlede egenskaper av preparatet som inneholder radionuklide-makrocyklisk-aminosfosfonsyrekomplekset den avgjørende faktor. Ulempene ved en enkelt egenskap kan oppveies av fortrinn ved én eller flere av egenskapene til ligand eller til radionuklide eller kombinasjonen av disse, og bruken av disse i preparatene må underkastes en helhetsvurdering.

Det foreligger et behov for preparater som har de etterfølgende kriterier, som gjør det mulig å avgi terapeutiske bestrålingsdoser til forkalkede svulster, med minimale doser avgitt til bløtt vev. Eksempelvis må radionukliden først og fremst avgis til benet i stedet for til bløtt vev. Særlig er opptak av radionukliden i lever eller blod uønsket. Dessuten bør radionukliden raskt kunne frigjøres fra ikke-benaktig vev for å unngå unødvendig skade i sådant vev, f.eks. bør den raskt renses ut fra blodet.

Den foreslåtte anvendelse for preparater og formuleringer inneholdende et kompleks fremstilt i henhold til oppfinnelsen, er den terapeutiske behandling av forkalkede svulster i dyr. I denne sammenheng innbefatter betegnelsen "forkalkede svulster" primærtumorer hvor skjelettsystemet er det første sted som involveres, eller andre vevs-tumorer som forkalkes, eller metastatisk bencancer hvor neoplasmene spres fra andre primærsteder, så som prostata og bryst, til skjelettsystemet. Kompleksene kan anvendes som hjelpe-midler for å lette smerte og/eller redusere størrelsen av og/eller hemme vekst og/eller spredning av, eller forårsake regresjon av og/eller ødeleggelse av, de forkalkede svulster ved å avgi en terapeutisk betrålingsdose.

Preparatet eller formuleringen kan administreres som en

enkelt dose eller som avdelte doser over et lengre tidsrom. Avgitt mengde av radionuklide til svulsten må være tilstrekkelig til å gi de ovenfor omtalte fordeler.

Den "effektive mengde" eller "terapeutisk effektive mengde" radionuklide-sammensetning som må gis for å behandle forkalkede svulster vil variere med slike faktorer som pasientens alder, vekt og helsetilstand, den forkalkede svulst som skal behandles, det valgte behandlingsregime så vel som av naturen av den spesielle radionuklide-sammensetning som gis. For eksempel vil det være behov for lavere aktivitet ved bruk av radionuklider med lengre halveringstider. Emisjonsenergien vil også være en faktor som bestemmer mengden av nødvendig aktivitet. Preparatene kan også benyttes i doser som er nyttige, men ikke terapeutiske.

Passende dose av preparatet eller formuleringen for bruk i denne sammenheng er minst 0,02 mCi per kg legemsvekt. En "terapeutisk effektiv dose" av preparatet eller formuleringen er minst 0,2 mCi per kg legemsvekt.

Den effektive mengde benyttet for å behandle forkalkede svulster vil kunne bli gitt, i alminnelighet ved administrasjon i blodstrømmen, som en enkelt dose eller som avdelte doser. De nødvendige mengder for å oppnå slik behandling, fastlegges lett av fagmannen.

Radionukliden og liganden kan kombineres under alle slags betingelser som gjør det mulig for de to å danne et kompleks. Generelt er blanding i vann ved kontrollert pH (valg av pH avhenger av valget av ligand og radionuklide) alt som trengs. Komplekset dannes ved en kjemisk binding og resulterer i et relativt stabilt radionuklide-preparat, f.eks. stabilt overfor dissosiasjon av radionukliden fra liganden.

De makrocykliske aminofosfonsyrekompleksene gir, når de administreres i et molforhold mellom ligand og metall på minst 1:1, fortrinnsvis fra 1:1 til 3:1, helst fra 1:1 til 1,5:1, biofordelinger overensstemmende med fremragende skjelett-virksomme midler. Derimot resulterer enkelte andre aminofosfonsyrekomplekser til en viss lokalisering i bløtt vev (f.eks. lever) om det ikke benyttes overskudd av ligand. Et stort overskudd av ligand er uønsket i og med at ukompleksert ligand kan være toksisk for

pasienten eller kan føre til hjertestans eller hypokalsemiske konvulsjoner. Dessuten er de makrocykliske aminofosfonsyreligandene nyttige når det trengs store mengder metall (dvs. for metaller som har en lav spesifikk aktivitet). I dette tilfelle har de makrocykliske aminofosfonsyreligander evnen til å avsette større mengder aktivitet i benvevet enn hva som er mulig når ikke-cykliske aminofosfonsyreligander benyttes.

Et foretrukket terapeutisk effektivt preparat eller formulering inneholder komplekser av minst én radionuklide av Gd-159, Ho-166, Lu-177, Sm-153, Y-90 og Yb-175 med DOTMP eller fysiologisk akseptable salter derav.

Kombinasjoner av de ovenfor angitte ulike radionuklider kan gis for terapeutisk behandling av forkalkede svulster. Kombinasjonene kan kompleksbindes som beskrevet her ved simultan kompleksring, blanding av to separat komplekserte radionuklider eller administrasjon av ulike komplekserte radionuklider etter hverandre. Det kan være mulig å oppnå de samme gunstige resultater med høy avgivning av radionukliden til svulstområdet, men med liten skade av bløtt vev, ved å gi liganden og radionukliden på en måte som tillater dannelse av radionuklide-chelantkomplekset in situ, så som ved samtidig eller tilnærmet samtidig administrasjon av radionukliden og en passende mengde ligand, eller ved administrasjon av ligand og en radionuklide kompleksert med en svakere ligand, dvs. en som undergår ligandutveksling med liganden i henhold til oppfinnelsen, slik at det ønskede radionuklide-chelantkompleks dannes via ligandutveksling in situ. Preparatet eller formuleringen kan gis som en enkelt dose eller som avdelte doser over et lenger tidsrom.

Aminofosfonsyrer kan fremstilles etter en rekke kjente synteseteknikker. Av særlig betydning er omsetningen av en forbindelse som inneholder minst ett reaktivt aminhydrogen, med en karbonylforbindelse (aldehyd eller keton) og fosforsyre eller derivater derav. Aminoforløperen (1,4,7,10-tetraazacyklododecan) benyttet ved fremstilling av makrocykliske aminofosfonsyrer er et kommersielt tilgjengelig materiale.

Fremgangsmåte for karboksy-alkylering for å oppnå amin-derivater som inneholder en karboksyalkylgruppe er velkjente (US-

patent 3.726.912), hvilket også gjelder fremgangsmåter som fører til alkylfosfon- og hydroksyalkylsubstituenten på amin-nitrogenatomene.

Radionuklidene kan fremstilles på flere måter. I en kjerne-reaktor bombarderes en nuklide med nøytroner for å oppnå en radionuklide, f.eks.



En annen prosess for å oppnå radionuklider består i bombardering av nuklider med partikler produsert i en lineær akselerator eller syklotron. En ytterligere måte for å oppnå radionuklider består i å isolere dem fra fisjonsproduktblandinger. Hvilken prosess som benyttes for å oppnå radionukliden er ikke av avgjørende betydning for foreliggende oppfinnelse.

For å bestråle Sm_2O_3 for fremstilling av Sm-153, ble for eksempel den ønskede mengde av mål-substansen først innveid i en kvartsampulle, ampullen flammeforseglet under vakuum og sveiset inn i en aluminiumboks. Boksen ble bestrålt i det ønskede tidsrom, avkjølt i flere timer og åpnet ved fjernstyring i en høyaktiv celle. Kvartsampullen ble fjernet og overført til en hanskeboks, knust i en glassampulle som deretter ble forseglet med et gummi-septum og en aluminium krympekapsel. En milliliter av 1 til 4M HCl ble deretter tilsatt ampullen med en sprøyte for å oppløse Sm_2O_3 . Oppløsningen ble deretter fortynnet til passende volum ved tilsetning av vann. Oppløsningen ble fjernet fra den opprinnelige oppløsningsampulle som inneholdt "chards" av den knuste kvartsampulle og overført med en sprøyte til et rent serum-glass. Denne oppløsningen ble deretter benyttet for kompleksfremstilling. Tilsvarende fremgangsmåter kan benyttes for fremstilling av Lu-177, Yb-175, Gd-159, Y-90 og Ho-166.

Komplekser fremstilt ifølge den her beskrevne oppfinnelse muliggjør avgivning av en terapeutisk mengde radioaktivitet til forkalkede svulster. Det kan imidlertid også være ønskelig å gi en "sub-terapeutisk" mengde (dvs. "nyttig mengde") for å bestemme skjebnen av radionukliden ved bruk av et scintillasjonskamera for administrasjon av en terapeutisk dose. Terapeutiske doser vil bli

administrert i tilstrekkelige mengder til å lette smerte og/eller hemme tumorvekst og/eller forårsake regresjon av svulster og/eller ødeleggelse av svulsten. De nødvendige mengder radionuklide for å gi den ønskede terapeutiske dose vil bli eksperimentelt fastlagt og optimalisert for hvert enkelt preparat. Mengden av radioaktivitet som trengs for å avgi en terapeutisk dose vil variere med de enkelte anvendte preparater. For eksempel vil radionuklider med lenger halveringstider fordre mindre aktivitet. Emisjonsenergien vil også være en faktor som bestemmer mengden av nødvendig aktivitet. Preparatene kan gis ved en enkelt behandling eller oppdelt i flere porsjoner og administrert til forskjellige tider. Administrasjon av preparatene i avdelte doser kan gjøre det mulig å minske skader på vev utenfor mål-området. Slik avdelt dosering kan være mer effektiv.

Preparatene kan benyttes sammen med andre virkestoffer og/eller ingredienser som øker den terapeutiske effekt av preparatene og/eller gjør administrasjon av preparatene lettere.

Undersøkelser for å bestemme den kvalitative biofordeling av de forskjellige radionuklider ble foretatt ved å injisere preparatene i rotter og foreta gammastråle-avbildning av hele dyret til ulike tidspunkter opptil 2 timer etter injeksjon.

Kvantitative biofordelinger ble oppnådd ved å injisere 50-100 μ l av preparatet i halevenen til uanestetiserte Sprague-Dawley hannrotter. Rottene ble deretter anbragt i bur kledd med absorberende papir for å samle opp all utskilt urin før avlivning. Etter et gitt tidsrom, ble dyrene avlivet ved cervikal dislokasjon og de forskjellige vev dissekert. Prøvene ble deretter rensset med saltvann, tørket med absorberende papir og veiet. Radioaktiviteten i prøvene ble målt med en NaI scintillasjonsteller.

De etterfølgende eksempler er inkludert for å lette forståelsen av oppfinnelsen, men må ikke oppfattes som begrensende for denne.

Fremstilling av utgangsmaterialer.

Eksempel A: Fremstilling av DOTMP

I en 100 ml trehalset rundkolbe forsynt med et termometer, tilbakeløpskjøler og varmekappe, ble det tilsatt 3,48 g (20,2 mmol) 1,4,7,10-tetraazacyklododecan og 14 ml vann. Oppløsningen ble behandlet med 17,2 ml konsentrert HCl og 7,2 g H_3PO_3 (87,8 mmol) og oppvarmet til 105°C. Den tilbakeløpskokende suspensjon ble kraftig omrørt og behandlet dråpevis med 13 g (160,2 mmol) formaldehyd (37vekt% i vann) i 1 time. Deretter ble reaksjonsblandingen kokt under tilbakeløpskjøling i ytterligere 2 timer, hvorpå oppvarmingen ble avbrutt og reaksjonsoppløsningen fikk avkjøles under henstand ved romtemperatur i 62,5 timer. Reaksjonsoppløsningen ble deretter konsentrert i vakuum ved 40°C til et viskøst rødbrunt halvfast stoff. En 30 ml porsjon vann ble tilsatt til det halvfast stoff som begynte å gå i oppløsning men deretter begynte å stivne. Hele suspensjonen ble deretter helt over i 400 ml aceton under kraftig omrøring. Det resulterende hvitaktige bunnfall ble vakuumfiltrert og tørket over natten for å gi 10,69 g (97% utbytte) rå DOTMP. En 2,0 g (3,65 mmol) prøve av det rå DOTMP ble oppløst i 2 ml vann ved tilsetning av 700 μ l konsentrert ammoniumhydroksyd (10,0 mmol) i 100 μ l porsjoner for å gi en oppløsning med pH 2-3. Denne oppløsningen ble deretter i sin helhet tilsatt til 4,5 ml 3N HCl (13,5 mmol), blandet grundig og satt tilside. I løpet av 1 time hadde små krystallprismer begynt å dannes på glass-sidene nedenfor væskeoverflaten. Krystallveksten fikk fortsette uforstyrret i ytterligere 111 timer, hvorpå krystallene forsiktig ble dunket av beholderveggen, vasket fire ganger med 3 ml porsjoner vann og luft-tørket til konstant vekt for å gi 1,19 g (60% utbytte) hvitt krystallinsk fast DOTMP.

Eksempel B: Fremstilling av DOTMP

I en 250 ml trehalset rundkolbe ble det anbragt 6,96 g (0,04 mol) 1,4,7,10-tetraazacyklododecan. Kolben ble tilsatt 14,5 g (0,177 mol) fosforsyrling, 30 ml deionisert vann og 28 ml konsentrert saltsyre (0,336 mol).

Kolben ble forbundet med en tilbakeløpskjøler og forsynt med en rørestav og et termometer utrustet med termostat. En separat oppløsning av 26,0 g (0,32 mol) vandig 37% formaldehydoppløsning ble anbragt i en 100 ml dråpetrakt som ble forbundet med kolben. Kolben ble bragt opp til kokepunktet (ca. 105°C) under kraftig omrøring. Formaldehydoppløsningen ble tilsatt dråpevis i løpet av et 30-40 minutters intervall. Oppløsningen ble oppvarmet og omrørt i ytterligere 3 timer og deretter langsomt avkjølt til romtemperatur.

Reaksjonsoppløsningen ble overført til en 500 ml rundkolbe og forbundet med en rotasjonsfordamper. Oppløsningen ble inndampet til en viskøs, ravfarvet halvfast masse (NB - temperaturen oversteg aldri 40°C). Dette halvfast stoff ble behandlet med ca. 300 ml aceton av HPLC-kvalitet, hvilket førte til en lysebrun, klebrig, viskøs olje. Denne oljen ble oppløst i 22 ml vann og langsomt tilsatt under kraftig omrøring til 1 liter aceton. Acetonet ble avdekantert og den lyse olje tørket under vakuum for å gi 16,6 g (76% utbytte) rå DOTMP. Til 13,1 g av det rå DOTMP ble det tilsatt 39,3 g deionisert vann sammen med en podekrySTALL, hvorpå oppløsningen fikk stå over natten. Det resulterende bunnfall ble vakuumfiltrert, vasket med kaldt vann og tørket under vakuum for å gi 4,75 g DOTMP (36% utbytte).

Ytterligere rensing ble foretatt ved å løse opp 3,0 g (5,47 mmol) av det ovenfor oppnådde DOTMP i 3 ml vann ved tilsetning av 2,2 ml (31,5 mmol) konsentrert ammoniumhydroksyd. Denne oppløsningen ble surgjort ved tilsetning av 2,4 ml (28,8 mmol) konsentrert HCl, hvilket førte til utfelling av et hvitt faststoff. Bunnfallet ble frafiltrert under vakuum og tørket for å gi 2,42 g (81% utbytte) rensed DOTMP som ble karakterisert ved en singlett ved 11,5 ppm (i forhold til 85% H₃PO₄) i det ³¹P dekooblede NMR-spektrum.

Eksempel C: Fremstilling av Sm-153

Sm-153 ble fremstillet i en reaktor (University of Missouri Research Reactor). Sm-153 fremstilles ved å bestråle 99,06% anriket $^{152}\text{Sm}_2\text{O}_3$ i den første rad-reflektor ved en nøytronflux på 8×10^{13} nøytron/cm².sek. Bestrålingene pågikk i alminnelighet i 50 til 60 timer som ga en Sm-153 spesifikk aktivitet på 1000-1300 Ci/g.

For å bestråle Sm_2O_3 for fremstilling av Sm-153, veies den ønskede mengde av målsubstans inn i en kvartsampulle, hvoretter ampullen flammeforsegles under vakuum og sveises inn i en aluminiumboks. Boksen bestråles i ønsket tidsrom, avkjøles i flere timer og åpnes ved fjernstyring i en høyaktiv celle. Kvartsampullen fjernes og overføres til en hanskeboks, åpnes i en glassampulle som deretter forsegles. En passende mengde av en oppløsning av saltsyre tilsettes deretter ampullen ved hjelp av en sprøyte for å løse opp Sm_2O_3 . Etter oppløsning av Sm_2O_3 , fortynnes samariumoppløsningen til det passende volum ved tilsetning av vann. Oppløsningen tas ut fra den opprinnelige oppløsningsampulle som inneholder kvartsskårene av bestrålingsampullen, og overføres via en sprøyte til et rent serum-glass.

Eksempel D: Fremstilling av HO-166

Holmium-166 fremstilles ved å veie inn 0,5-1,0 mg Ho_2O_3 i en kvartsampulle. Ampullen forsegles og anbringes i en aluminiumboks som deretter sveises igjen. Prøven bestråles (vanligvis i 24-72 timer) i reaktoren (første rad-reflektor, nøytronflux på 8×10^{13} nøytron/cm².sek). Etter bestråling åpnes ampullen og oksydet oppløses ved bruk av 4N HCl. Det kan være nødvendig med oppvarming. Vann benyttes deretter for å fortynne prøven til et passende volum.

Eksempel E: Fremstilling av Gd-159

Gadolinium-159 fremstilles ved å forsegle gadoliniumoksyd (1,1 mg) i en kvartsampulle. Ampullen sveises inn i en aluminiumboks og bestråles i 30 timer i en reaktor ved en nøytronflux på 8×10^{13} nøytron/cm².sek. Innholdet i kvartsampullen oppløses ved bruk av HCl. Vann tilsettes for å oppnå en oppløsning av Gd-159 i 0,1N HCl.

Eksempel F: Fremstilling av Y-90

En ikke-radioaktiv yttrium- (Y) oppløsning ble fremstillet ved å oppløse 15,1 mg YCl₃.6H₂O i 11,24 ml vann. Av denne oppløsning ble 1500 µl tilsatt til en ampulle som inneholdt 0,5 ml Y-90-oppløsning (fremstillet ved nøytronbestråling av 1 mg Y₂O₃, etterfulgt av oppløsning i 1N HCl for å gi et sluttvolum på 0,5 ml).

Eksempel G: Fremstilling av Yb-175 og Lu-177

Ved gjentakelse av fremgangsmåten i Eksemplene C, D, E eller F ble radioisotopene av ytterbium-175 (Yb-175) og lutetium-177 (Lu-177) fremstillet.

Fremstilling av sluttprodukter.

Eksempel 1: Fremstilling og biofordeling av
Sm-DOTMP og Sm-153-DOTMP

Liganden fra Eksempel A (22 mg) ble oppløst i 878 µl destillert vann og 15 µl 50% NaOH. Et volum på 15 µl av denne oppløsning ble overført til en ampulle inneholdende 1,5 ml Sm-oppløsning (0,3 mmol Sm i 0,1N HCl forsterket med 2 µl Sm-153 tracer). pH ble justert til 7-8 ved bruk av NaOH, og mengden av Sm funnet som et kompleks var ifølge ionebytter-kromatografi >99%. Dette ga en oppløsning som inneholdt Sm i 0,3 mmol med et molart forhold mellom ligand og metall på ca. 1,5.

Sprague-Dawley rotter fikk akklimatiseres i 5 dager før injeksjon av 100 µl av den ovenfor beskrevne Sm-oppløsning, via en

halevene. Rottene veide mellom 150 og 200 g ved injeksjonstidspunktet. Etter 2 timer ble rottene avlivet ved cervikal dislokasjon og dissekert. Mengden av radioaktivitet i hvert enkelt vev ble bestemt ved telling i en NaI scintillasjonsteller koblet til en flerkannelsanalysator. Telle-resultatet ble sammenlignet med tellingen i 100 μ l standarder for å bestemme prosentinnholdet av dosen i hvert vev eller organ. Prosentinnholdet av den injiserte dose i flere vev er angitt i Tabell I. Tallene utgjør gjennomsnittet av 3 rotter per datapunkt.

Tabell I

% injisert dose i flere vev for Sm-DOTMP¹

Vev	% dose
Ben	58,1
Lever	0,06
Nyre	0,27
Milt	0,004
Muskel	0,15
Blod	0,004

¹ Molart forhold mellom lignad og Sm ca. 1,5.

Eksempel 2: Fremstilling og biofordeling av
Ho-DOTMP og Ho-166-DOTMP

Liganden fra Eksempel A (22 mg) ble oppløst i 878 μ l destillert vann og 15 μ l 50% NaOH. Et volum på 30 μ l av denne oppløsning ble overført til en ampulle inneholdende 1,5 ml Ho-oppløsning (0,6 mmol Ho i 0,1N HCl forsterket med 2 μ l Ho-166 tracer). pH ble justert til 7-8 ved bruk av NaOH, og mengden av Ho funnet som et kompleks var ifølge ionebytterkromatografi >99%. Dette ga en oppløsning som inneholdt 0,6 mmol Ho i et molart forhold mellom ligand og metall på ca. 1,5.

Sprague-Dawley rotter fikk akklimatiseres i 5 dager før injeksjon av 100 μ l av den ovenfor beskrevne Ho-oppløsning, via en halevene. Rottene veide mellom 150 og 200 g ved injeksjonstidspunktet. Etter 2 timer ble rottene avlivet ved cervikal dislokasjon og dissekert. Mengden av radioaktivitet i hvert enkelt vev ble bestemt ved telling i en NaI scintillasjons-teller koblet til en flerkannelsanalysator. Telle-resultatet ble sammenlignet med tellingen i 100 μ l standarder for å bestemme prosentinnholdet av dosen i hvert vev eller organ. Prosentinnholdet av den injiserte dose i flere vev er angitt i Tabell II. Tallene utgjør gjennomsnittet av 3 rotter per datapunkt.

Tabell II

% injisert dose i flere vev for Ho-DOTMP¹

Vev	% dose
Ben	57
Lever	0,07
Nyre	0,4
Milt	0,006
Muskel	0,3
Blod	0,07

¹ Molart forhold mellom lignad og Ho ca. 1,5.

Eksempel 3: Fremstilling og biofordeling av
Sm-DOTMP, Sm-153-DOTMP, Ho-DOTMP og
Ho-166-DOTMP

En mengde på 14,5 mg av liganden fra Eksempel B ble anbragt i en ampulle og oppløst i 760 μ l vann og 5 μ l 50% NaOH. Et volum på 1100 μ l Sm-oppløsning (0,3 mmol Sm i 0,1N HCl) som var forsterket med Sm-153, ble anbragt i en separat ampulle og tilsatt 10 μ l av ligandoppløsningen. Oppløsningens pH ble justert til 7-8 med NaOH, og oppløsningen ble sendt gjennom 3 plastkolonner som inneholdt 1,5 ml kationebytter-harpiks (SephadexTM C-25 fra Pharmacia).

Mengden av Sm som et kompleks ble ved kationebytter-kromatografi bestemt til 99%.

Et volum på 1100 μ l Ho-oppløsning (0,6 mmol Ho i 0,1N HCl) som var forsterket med Ho-166, ble anbragt i en separat ampulle og tilsatt 20 μ l av den ovenfor oppnådde ligandoppløsning. Oppløsningens pH ble justert til 7-8 med NaOH, og oppløsningen ble sendt gjennom 2 plastkolonner som inneholdt 1,5 ml kationebytter-harpiks (Sephadex™ C-25 fra Pharmacia). Mengden av Ho som et kompleks, ble ved kationebytter-kromatografi bestemt til 99%.

Sprague-Dawley rotter fikk akklimatiseres i 5 dager før injeksjon av 100 μ l av de ovenfor beskrevne oppløsninger, via en halevene. Rottene veide mellom 150 og 200 g ved injeksjonstidspunktet. Etter 2 timer ble rottene avlivet ved cervikal dislokasjon. Vev ble tatt ut og veiet, hvorpå mengden av radioaktivitet ble bestemt ved telling i en NaI scintillasjons-teller koblet til en flerkanalsanalysator. Telle-resultatet for hvert vev ble sammenlignet med tellingen i 100 μ l standarder for å bestemme prosentinnholdet av dosen i hvert vev eller organ. Prosentinnholdet av den injiserte dose i flere vev er angitt i Tabell III. Tallene utgjør gjennomsnittet av 3 rotter per datapunkt.

Tabell III

% injisert dose i flere vev
for DOTMP metallkomplekser

Vev	Sm	Ho
Ben	50	64
Lever	0,37	0,19
Nyre	0,29	0,32
Milt	0,04	0,05
Muskel	0,49	0,22
Blod	0,12	0,17

Eksempel 4: Fremstilling og biofordeling av Gd-DOTMP og Gd-159-DOTMP

Liganden fra Eksempel B (14,5 mg) ble anbragt i en ampulle og oppløst i 760 μl vann og 5 μl 50% NaOH. Et volum på 1000 μl Gd-oppløsning (0,3 mmol Gd i 0,1N HCl) som inneholdt spormengder Gd-159 ble anbragt i en separat ampulle og tilsatt 15 μl av ligandoppløsningen. Oppløsningens pH ble justert til 7-8 med NaOH og mengden av Gd som kompleks ble ved kationebytter-kromatografi bestemt til >99%.

En Sprague-Dawley rotte fikk akklimatiseres i 5 dager før injeksjon av 175 μl av den ovenfor beskrevne oppløsning via en halevene. Rotten veide 155 g ved injeksjonstidspunktet. Etter 2 timer ble rotten avlivet ved cervical dislokasjon og dissekert. Mengden av radioaktivitet i hvert enkelt vev ble bestemt ved telling i en NaI scintillasjonsteller koblet til en flerkanal-analysator. Telle-resultatet for hvert vev ble sammenlignet med tellingen i 175 μl standarder for å bestemme prosentinnholdet av dosen i hvert vev eller organ. Prosentinnholdet av den injiserte dose i flere vev er angitt i Tabell IV.

Tabell IV

% injisert dose i flere vev for Gd-DOTMP¹

Vev	% dose
Ben	50
Lever	0,08
Nyre	0,25
Milt	intet påvist*
Muskel	0,08
Blod	0,06

¹ Molart forhold mellom lignad og Gd ca. 1,5.

* Telleresultatet for milt var lavere enn bakgrunnsnivået.

Eksempel 5: Fremstilling og biofordeling av
Lu-DOTMP og Lu-177-DOTMP

Liganden fra Eksempel B (15,8 mg) ble oppløst i 963 μ l destillert vann og 8 μ l 50% NaOH. Et volum på 15 μ l av denne oppløsningen ble overført til en ampulle som inneholdt 1,5 ml Lu-oppløsning (0,3 mmol Lu i 0,1N HCl forsterket med 2 μ l Lu-177 tracer). pH ble justert til 7-8 med NaOH og mengden av Lu funnet som kompleks ble ved kationebytter-kromatografi bestemt til >99%. Dette førte til en oppløsning som inneholdt 0,3 mmol Lu med et molart forhold mellom ligand og metall på ca. 1,5.

Sprague-Dawley rotter fikk akklimatiseres i 5 dager før injeksjon av 100 μ l av de ovenfor beskrevne Lu-oppløsninger, via en halevene. Rottene veide mellom 150 og 200 g ved injeksjonstidspunktet. Etter 2 timer ble rottene avlivet ved cervikal dislokasjon og dissekert. Mengden av radioaktivitet i hvert enkelt vev ble bestemt ved telling i en NaI scintillasjons-teller koblet til en flerkanalsanalysator. Telle-resultatet ble sammenlignet med tellingen i 100 μ l standarder for å bestemme prosentinnholdet av dosen i hvert vev eller organ. Prosentinnholdet av den injiserte dose i flere vev er angitt i Tabell V. Tallene representerer gjennomsnittet av 3 rotter per datapunkt.

Tabell V

% injisert dose i flere vev for Lu-DOTMP¹

Vev	% dose
Ben	54
Lever	0,08
Nyre	0,3
Milt	0,006
Muskel	0,04
Blod	0,09

¹ Molart forhold mellom ligand og Lu ca. 1,5.

Eksempel 6: Fremstilling og biofordeling av
Y-DOTMP og Y-90-DOTMP

Til en oppløsning av Y og Y-90 fremstillet i Eksempel F, ble det tilsatt 200 μ l (0,0266 mol) DOTMP fra Eksempel B i vann og oppløsningens pH justert til 7,5 med 50% NaOH og 1N NaOH. Prosentinnholdet av Y funnet som et kompleks ble ved kationebytter-kromatografi bestemt til >99%. Dette ga en oppløsning med et molart forhold mellom ligand og metall på ca. 1,7.

Sprague-Dawley rotter fikk akklimatiseres i 8 dager før injeksjon av 150 μ l av de ovenfor beskrevne Y-oppløsninger, via en halevene. Rottene veide mellom 150 og 200 g ved injeksjonstidspunktet. Etter 2 timer ble rottene avlivet ved cervikal dislokasjon og dissekert. Mengden av radioaktivitet i hvert enkelt vev ble bestemt ved telling i en NaI scintillasjonsteller koblet til en flerkanalsanalysator. Telle-resultatet for hvert vev ble sammenlignet med tellingen i 150 μ l standarder for å bestemme prosentinnholdet av dosen i hvert vev eller organ. Prosentinnholdet av den injiserte dose i flere vev er angitt i Tabell VI. Tallene utgjør gjennomsnittet av 5 rotter per datapunkt.

Tabell VI

% injisert dose i flere vev for Y-DOTMP¹

Vev	% dose
Ben	33
Lever	0,06
Nyre	0,35
Milt	0,01
Muskel	0,31
Blod	0,12

¹ Molart forhold mellom ligand og Y ca. 1,7.

Eksempel W (sammenligning)

Til en ampulle inneholdende 0,5 ml Y-90-oppløsning (fremstillet ved bestråling av 1 mg Y_2O_3 etterfulgt av oppløsning i 1,1N HCl for å gi et sluttvolum på 0,5 ml), ble det tilsatt 1,5 ml vann for å gi en $8,86 \times 10^{-3}$ molar oppløsning av Y som inneholdt tracer Y-90. Til 2 ml ($1,772 \times 10^{-5}$ mol) av denne oppløsningen ble det tilsatt 133 μ l ($1,676 \times 10^{-4}$ mol) 1,26M etylendiamintetrametylenfosfonsyre (EDTMP)-oppløsning, hvoretter oppløsningen ble blakket. Oppløsningen klarnet ved tilsetning av 50 μ l 50% NaOH. Til denne oppløsningen ble det tilsatt ytterligere 40 μ l ($5,04 \times 10^{-5}$ mol) 1,26M EDTMP-oppløsning. pH av den resulterende oppløsning var 7,5 og prosentinnholdet av Y som et kompleks ble ved kationebytter-kromatografi bestemt til >99%. Dette ga en oppløsning med et molart forhold mellom ligand og metall på ca. 123.

Sprague-Dawley rotter fikk akklimatiseres i 8 dager før injeksjon av 150 μ l av de ovenfor beskrevne Y-oppløsninger, via en halevene. Rottene veide mellom 150 og 200 g ved injeksjonstidspunktet. Etter 2 timer ble rottene avlivet ved cervikal dislokasjon. Vev ble tatt ut og veiet, og mengden av radioaktivitet i hvert enkelt vev ble bestemt ved telling i en NaI scintillasjonsteller koblet til en flerkanalsanalysator. Telleresultatet for hvert vev ble sammenlignet med tellingen i 150 μ l standarder for å bestemme prosentinnholdet av den injiserte dose i hvert vev eller organ. Prosentinnholdet av den injiserte dose i flere vev er angitt i Tabell VI. Tallene utgjør gjennomsnittet av 5 rotter per datapunkt.

Tabell W

% injisert dose i flere vev for Y-EDTMP¹

Vev	% dose
Ben	30
Lever	0,09
Nyre	0,30
Milt	0,01
Muskel	0,58
Blod	0,15

¹ Molart forhold mellom ligand og Y ca. 123.

(Det er ingen Eksempler X og Y)

Eksempel Z (sammenligning)

Etter en tilsvarende fremgangsmåte som den som ovenfor er benyttet, ble det fremstillet preparater som inneholdt komplekser av Sm-153 med flere kommersielt tilgjengelige fosfonsyrer som ikke inneholder alkylbindingen mellom nitrogen- og fosforatomene (en binding som er nødvendig i foreliggende ligand).

To timers biolokaliseringen av Sm-153 i rotter for disse preparatene ble bestemt som tidligere beskrevet. Resultatene er angitt i Tabell X. De anvendte ligander innbefatter metylendi-fosfonsyre (MDP) og hydroksyetylidin-difosfonsyre (HEDP) som inneholdt henholdsvis en P-CH₂-PO₃H₂ og en P-C(CH₃)(OH)-PO₃H₂-binding; pyrofosfat (PYP) som inneholdt en P-O-PO₃H₂-binding; og imido-difosfat (IDP) som inneholdt en N-PO₃H₂-binding. Metallkomplekser av disse ligander er kjente "skeletal agents". For eksempel er Tc-komplekser av MDP, HEDP og PYP blitt benyttet kommersielt som ben-diagnostiske midler. Disse ligandene var imidlertid uegnet for selektiv avgivning av Sm-153 til skjelettsystemet, eksemplifisert ved den store andel av radioaktivitet funnet i leveren og/eller blodet.

Tabell Z viser biolokaliseringen av Sm-153 i rotter 2 timer etter injeksjon, og resultatene representerer prosentandelen av injisert dose i vev.

Tabell Z

% dose i	Sm-153 MDP	Sm-153 HEDP	Sm-153 PYP	Sm-153 IDP
Ben	2	21	2	0,6
Lever	85	3,5	73	36
Blod	0,23	13	0,23	0,04

Tallene angitt i Tabell Z for Sm-153-MDP, Sm-153-HEDP, Sm-153-PYP og Sm-153-IDP representerer gjennomsnittet av resultatet av henholdsvis fem, fem, tre og tre rotter.

Eksempel 7: Fremstilling av reagenssett av Sm-DOTMP eller Ho-DOTMP ved bruk av HEPES-buffer

En 0,1M oppløsning av N-2-hydroksyetyl piperazin-N'-2-etansulfonsyre (HEPES) (Sigma™ Chemical Co., St. Louis, MO) med en pH på 7,43 ble fremstillet. En 0,0066M oppløsning av DOTMP ble fremstillet ved å løse opp 68,2 mg ($1,084 \times 10^{-4}$ μ mol) DOTMP i 16,4285 ml 1N NaOH. I hvert av syv 10 ml serum-glass ble det anbragt 0,600 ml (3,96 mol) DOTMP-oppløsning og 3,00 ml 0,1M HEPES-bufferoppløsning. Hvert serum-glass ble deretter anbragt i et tørris/acetone-bad inntil væsken var frossen og deretter anbragt i et Virtis frysetørker-apparat over natten, hvorved de vandige komponentene gikk over i et tørt hvitt pulver i bunnen av serum-glassene. Serum-glassene ble deretter proppet og forseglet ved krymping. Settene ble formulert for å motta 6 ml av enten SmCl₃ (3×10^{-4} mol) eller HoCl₃ (6×10^{-4} mol) i 0,1N HCl.

Eksempel 8: Rekonstitusjon av reagenssett av Sm-DOTMP eller Ho-DOTMP inneholdende HEPES-buffer

En 6,0 ml tilsetning av SmCl_3 ($3 \times 10^{-4}\text{M}$ forsterket med Sm-153 i 0,1N HCl) ble foretatt til et av glassene i settene beskrevet i Eksempel 7. pH i de resulterende rekonstituerte sett var 7,5 og prosentinnholdet av kompleksert Sm ble ved kationebytter-kromatografi bestemt til >99%.

Tilsvarende ble en 6,0 ml tilsetning av HoCl_3 ($6 \times 10^{-4}\text{M}$ forsterket med Ho-166) i 0,1N HCl gjort til et av glassene beskrevet i Eksempel 7. pH i den resulterende oppløsning var 7,5 og prosentinnholdet av kompleksert Ho ble ved kationebytter-kromatografi bestemt til >97%.

Eksempel 9: Rekonstitusjon og biofordeling av Sm-HEPES-DOTMP sett

Et glass i settet fra Eksempel 8 ble behandlet med 6,0 ml SmCl_3 ($3 \times 10^{-4}\text{M}$ forsterket med Sm-153) i 0,1N HCl. pH i den resulterende oppløsning var 7,5 og prosentinnholdet av Sm som et kompleks ble bestemt ved kationebytter-kromatografi til >99%.

Sprague-Dawley rotter fikk akklimatiseres i 5 dager før injeksjon av 100 μl av de ovenfor beskrevne Sm-oppløsninger, via en halevene. Rottene veide mellom 150 og 200 g ved injeksjonstidspunktet. Etter 2 timer ble rottene avlivet ved cervical dislokasjon. Vev ble tatt ut og veiet, hvorpå mengden av radioaktivitet i hvert enkelt vev ble bestemt ved telling i en NaI scintillasjonsteller koblet til en flerkanalsanalysator. Tellerresultatet for hvert vev ble sammenlignet med tellingen i 100 μl standarder for å bestemme prosentinnholdet av injisert dose i hvert vev eller organ. Prosentinnholdet av den injiserte dose i flere vev er angitt i Tabell VII. Tallene utgjør gjennomsnittet av 3 rotter per datapunkt.

Tabell VII

% injisert dose i flere vev for Sm-DOTMP/HEPES-buffer

Vev	% dose
Ben	58
Lever	0,06
Nyre	0,29
Milt	0,01
Muskel	0,18
Blod	0,06

Eksempel 10: Fremstilling av Sm-DOTMP sett ved bruk av bikarbonat-buffer

En 0,009M oppløsning av DOTMP med pH 6,66 ble fremstillet ved å tilsette 141,5 mg ($2,25 \times 10^{-4}$ mol) DOTMP til 9 ml 1N NaOH og fortynne til 25 ml sluttvolum. En 0,4M oppløsning av natriumbikarbonat (NaHCO_3) ble fremstillet ved å løse opp 8,4 g NaHCO_3 i 250 ml vann. Sett ble fremstillet ved å tilsette 3,0 ml NaHCO_3 -oppløsning og 0,300 ml DOTMP-oppløsning til hvert av syv 10 ml serum-glass og behandle dem som beskrevet i Eksempel 7 for å gi det endelige sett som inneholdt et hvitt tørt faststoff. Disse sett ble formulert med henblikk på å motta 6,0 ml SmCl_3 ($3 \times 10^{-4}\text{M}$) i 0,1N HCl som ville gi et molart forhold mellom ligand og metall på 1,5:1.

Eksempel 11: Rekonstitusjon og biofordeling av

Sm-DOTMP sett ved bruk av bikarbonat-buffer

Et glass fra settet fra Eksempel 10 ble fremstillet med 6,0 ml SmCl_3 ($3 \times 10^{-4}\text{M}$ forsterket med Sm-153) i 0,1N HCl. pH i den resulterende oppløsning var 6,55 og ble justert til 7,27 ved tilsetning av 60 μl 1N NaOH. Prosentinnholdet av Sm som et kompleks ble ved kationebytter-kromatografi bestemt til >99%.

Sprague-Dawley rotter fikk akklimatiseres i 5 dager før injeksjon av 100 μ l av de ovenfor beskrevne Sm-oppløsninger, via en halevene. Rottene veide mellom 150 og 200 g ved injeksjonstidspunktet. Etter 2 timer ble rottene avlivet ved cervical dislokasjon. Vev ble tatt ut og veiet, hvorpå mengden av radioaktivitet i hvert enkelt vev ble bestemt ved telling i en NaI scintillasjonsteller koblet til en flerkanalsanalysator. Tellerresultatet for hvert vev ble sammenlignet med tellingen i 100 μ l standarder for å bestemme prosentinnholdet av dosen i hvert vev eller organ. Prosentinnholdet av den injiserte dose i flere vev er angitt i Tabell VIII. Tallene utgjør gjennomsnittet av 3 rotter per datapunkt.

Tabell VIII

% injisert dose i flere vev for Sm-DOTMP¹/bikarbonat

Vev	% dose
Ben	65
Lever	0,07
Nyre	0,34
Milt	0,01
Muskel	0,30
Blod	0,04

¹ Molart forhold mellom ligand og Sm ca. 1,5.

Eksempel 12: Fremstilling av DOTMP sett ved bruk av baseoverskudd

En 0,009M oppløsning av DOTMP ble fremstillet som beskrevet i Eksempel 10 bortsett fra at mer NaOH ble tilsatt slik at slutt-oppløsningen hadde en pH på 10,66. Sett ble fremstillet ved å tilsette 0,300 ml DOTMP-oppløsning og 0,700 ml 1,0N NaOH-oppløsning til hvert av fem 10 ml serum-glass og behandle dem som beskrevet i Eksempel 7 for å gi det endelige sett som inneholdt et hvitt tørt faststoff. Settene ble formulert med henblikk på å motta 6,0 ml SmCl₃ (3×10^{-4} M) i 0,1N HCl som ville gi et molart forhold mellom ligand og metall på 1,5:1.

Eksempel 13: Rekonstitusjon og biofordeling av
DOTMP sett ved bruk av baseoverskudd
og fosfatbuffer

Et glass fra settet fra Eksempel 12 ble behandlet med 5,4 ml SmCl_3 ($3 \times 10^{-4}\text{M}$ forsterket med Sm-153) i 0,1N HCl og 0,6 ml SmCl_3 ($3 \times 10^{-4}\text{M}$ forsterket med Sm-153) i 0,1N HCl. pH i den resulterende oppløsning var mellom 10 og 11. pH ble justert til 7,79 ved tilsetning av 0,200 ml 1,05M fosfatbuffer (pH 7,49). Prosentinnholdet av Sm som et kompleks ble ved kationebytter-kromatografi bestemt til >99%.

Sprague-Dawley rotter fikk akklimatiseres i 5 dager før injeksjon av 100 μl av de ovenfor beskrevne Sm-oppløsninger, via en halevene. Rottene veide mellom 150 og 200 g ved injeksjonstidspunktet. Etter 2 timer ble rottene avlivet ved cervikal dislokasjon. Vev ble tatt ut og veiet og mengden av radioaktivitet i hvert enkelt vev bestemt ved telling i en NaI scintillasjons-teller koblet til en flerkanalsanalysator. Telle-resultatet ble sammenlignet med tellingen i 100 μl standarder for å bestemme prosentinnholdet av den injiserte dose i hvert vev eller organ. Prosentinnholdet av den injiserte dose i flere vev er angitt i Tabell IX. Tallene utgjør gjennomsnittet av 5 rotter per datapunkt.

Tabell IX

% injisert dose i flere vev for Sm-DOTMP¹/fosfat

Vev	% dose
Ben	59
Lever	0,85
Nyre	0,41
Milt	0,03
Muskel	0,35
Blod	0,11

¹ Molart forhold mellom ligand og Sm ca. 1,5.

Eksempel 14: Fremstilling av 18 ml Ho-DOTMP sett

En 0,009M oppløsning av DOTMP ved pH 6,66 ble fremstillet som beskrevet i Eksempel 10 bortsett fra at mer NaOH ble tilsatt slik at sluttoppløsningen hadde en pH på 10,19. Sett ble fremstillet ved tilsetning av 1,800 ml DOTMP-oppløsning og 2,100 ml 1N NaOH-oppløsning til hvert av tolv 20 ml serum-glass. Glassene ble deretter behandlet som beskrevet i Eksempel 7 for å gi det endelige sett som inneholdt et hvitt, tørt faststoff. Settene ble formulert med henblikk på å motta 18,0 ml HoCl_3 ($6 \times 10^{-4}\text{M}$) som ville gi et molart forhold mellom ligand og metall på 1,5:1.

Eksempel 15: Rekonstitusjon og biofordeling av
18 ml Ho-DOTMP sett

Et glass fra settet fra Eksempel 14 ble behandlet med 18,0 ml HoCl_3 ($6 \times 10^{-4}\text{M}$ forsterket med Ho-166) i 0,1N HCl. Oppløsningen ble behandlet med 0,6 ml 1,05M fosfatbuffer (pH 7,49) som bragte pH ned til 7,53. Prosentinnholdet av Sm som et kompleks ble ved kationebytter-kromatografi bestemt til >99%.

Sprague-Dawley rotter fikk akklimatiseres i 5 dager før injeksjon av 100 μl av de ovenfor beskrevne Sm-oppløsninger, via en halevene. Rottene veide mellom 150 og 200 g ved injeksjonstidspunktet. Etter 2 timer ble rottene avlivet ved cervical dislokasjon. Vev ble tatt ut og veiet og mengden av radioaktivitet i hvert enkelt vev ble bestemt ved telling i en NaI scintillasjons-teller koblet til en flerkannelsanalysator. Telle-resultatet for hvert vev ble sammenlignet med tellingen i 100 μl standarder for å bestemme prosentinnholdet av den injiserte dose i hvert vev eller organ. Prosentinnholdet av den injiserte dose i flere vev er angitt i Tabell X. Tallene utgjør gjennomsnittet av 5 rotter per datapunkt.

Tabell X

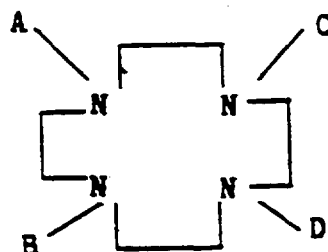
% injisert dose i flere vev for Ho-DOTMP¹/fosfat

Vev	% dose
Ben	60
Lever	0,12
Nyre	0,35
Milt	0,08
Muskel	0,21
Blod	0,04

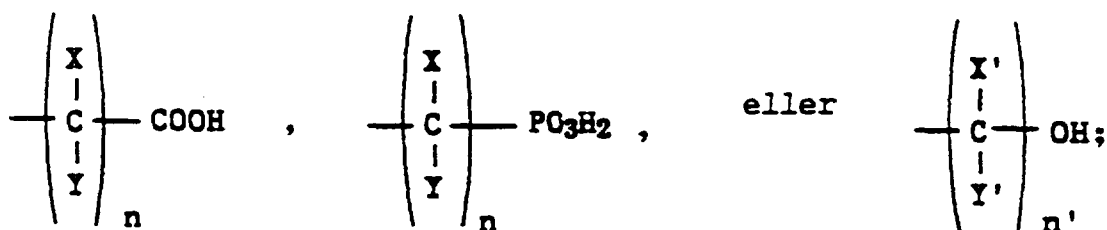
¹ Molart forhold mellom ligand og Ho ca. 1,5.

P a t e n t k r a v

1. Fremgangsmåte for fremstilling av et makrocyklisk amino-fosfonsyre-kompleks, eller et fysiologisk akseptabelt salt derav, som har en ligand som er en makrocyklisk aminofosfonsyre med strukturen



hvor substituentene A, B, C og D uavhengig av hverandre er hydrogen, hydrokarbonradikaler som har 1-8 karbonatomer eller en del med formel



og fysiologisk akseptable salter av syreradikalene, hvor X og Y uavhengig av hverandre er hydrogen, hydroksyl-, karboksyl-, fosfon- eller hydrokarbonradikaler med 1-8 karbonatomer samt fysiologisk akseptable salter av syreradikalene; og n er 1-3, med det forbehold at når $n > 1$, kan X og Y være like eller forskjellige fra tilsvarende X og Y på et annet karbonatom, X' og Y' uavhengig av hverandre er hydrogen, metyl- eller etylradikaler; n' er 2 eller 3, med det forbehold at minst to av de nevnte nitrogensubstituentene er en fosforholdig gruppe, og minst én radionuklide av Sm-153, Gd-159, Ho-166, Lu-177, Y-90 eller Yb-175, k a r a k t e r i s e r t v e d omsetning av liganden med en radionuklide av Sm-153, Gd-159, Ho-166, Lu-177, Y-90 eller Yb-175, med et molart forhold mellom ligand og radionuklide på minst 1:1, i vann ved kontrollert pH, og eventuelt dannes et fysiologisk godtagbart salt derav, og eventuelt tilsetning av en farmasøytisk godtagbar bærer.

2. Fremgangsmåte ifølge krav 1,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den makrocykliske amino-
fosfonsyre som anvendes er 1,4,7,10-tetraazacyklo-dodekan-1,4,7,10-
tetrametylenfosfonsyre eller et fysiologisk akseptabelt salt.

3. Fremgangsmåte ifølge krav 2,
k a r a k t e r i s e r t v e d at radionukliden som anvendes
er Sm-153 eller Ho-166.

4. Fremgangsmåte ifølge et av kravene 1-3,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det anvendes et molart
forhold mellom ligand og radionuklide på fra 1:1 til 3:1.

5. Fremgangsmåte ifølge et av kravene 1-3,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det anvendes et molart
forhold mellom ligand og radionuklide på fra 1:1 til 1,5:1.