

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **240772**
(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **429333**

(22) Data zgłoszenia: **19.03.2019**

(51) Int.Cl.

A61K 51/06 (2006.01)

A61K 51/12 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C08B 37/02 (2006.01)

C08B 37/08 (2006.01)

A61K 103/30 (2006.01)

A61K 103/32 (2006.01)

(54) **Sposób wytwarzania nanocząstek polimerowych chelatujących izotopy
promieniotwórcze do zastosowania w diagnostyce i terapii**

(30) Pierwszeństwo:

11.06.2018, PL, P.425884

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

21.09.2020 BUP 20/20

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

06.06.2022 WUP 23/22

(73) Uprawniony z patentu:

**NANOTHEA SPÓŁKA AKCYJNA,
Warszawa, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**TOMASZ CIACH, Warszawa, PL
MAGDALENA JANCZEWSKA, Warszawa, PL
JOLANTA DUSZAK, Warszawa, PL
MICHAŁ TOMASZ ZUK, Szczecin, PL
MICHAŁ SZKOP, Warszawa, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Lidia Chlebicka

PL 240772 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania nanocząstek polimerowych zdolnych do chelowania izotopów promieniotwórczych z możliwością modyfikacji powierzchni specyficznymi molekułami kierującymi do określonego rodzaju komórek nowotworowych i/lub nowotworowej przestrzeni międzykomórkowej oraz sposób znakowania w/w nanocząstek izotopami promieniotwórczymi do diagnostyki Pozytyonową Tomografią Emisyjną (PET), SPECT PET/MR, a także radioizotopami o własnościach terapeutycznych do stosowania w miejscowej brachyterapii.

Diagnostyka choroby nowotworowej w jej wczesnym stadium istotnie wpływa na skuteczność leczenia. Wymaga ona jednak specjalistycznych narzędzi, bowiem nowotwory we wczesnym stadium mogą nie powodować objawów klinicznych, bądź objawy te mogą być mało charakterystyczne. Późne wykrycie nowotworu zmniejsza szanse na skuteczne leczenie.

Raport opublikowany przez Amerykańskie Towarzystwo Nowotworowe (Cancer Facts and Figures 2015 American Cancer Society) potwierdza, że przewidywalna przeżywalność w ciągu 5 lat od diagnozy choroby zmienia się znacząco w zależności od stopnia jej zaawansowania. Opisano trzy stadia rozwoju choroby: 1. lokalny – komórki nowotworowe są obecne jedynie w miejscu kanцерogenezy, 2. regionalny – kiedy komórki dały przerzuty na sąsiadujące organy oraz 3. globalny – komórki nowotworowe obecne są w odległych organach i tkankach. Przykładowo, przeżywalność w okresie 5 lat od diagnozy nowotworu piersi wynosi aż 99%, jeżeli został on zdiagnozowany w stadium lokalnym, 85% w stadium regionalnym i tylko 25% w ostatnim stadium. Postawienie wczesnej diagnozy wymaga jednak precyzyjnych narzędzi.

Metodami umożliwiającymi nieinwazyjną diagnostykę są m.in. metody wykorzystujące promienionowanie jonizujące izotopów promieniotwórczych. Podane ogólnoustrojowo znaczniki są szansą na wykrycie ognisk nowotworowych również w stadium przerzutów. Najpowszechniej stosowanym jest ¹⁸F-FDG – fluorodeoksyglukoza (90% udziałów na rynku), analog glukozy znakowany promieniotwórczym izotopem fluoru ¹⁸F. Izotop fluoru ¹⁸F ma krótki czas półtrwania (110 min.), więc niemal w 2 godziny od syntezy marker ten traci połowę swoich właściwości wykrywania komórek nowotworowych. Następstwem tego jest praktyka budowania przyszpitalnych oddziałów syntezy chemicznej, gdzie przy wykorzystaniu cyklotronów FDG jest syntezowane w kilku etapach, bezpośrednio przed podaniem do pacjenta. Szpitale, które nie mają dostępu do cyklotronu, ponoszą ogromne koszty związane z transportem znacznika do szpitala (m.in. wykorzystując helikoptery). FDG nie jest jednak znacznikiem bez wad. Niektóre nowotwory wykazują niskie powinowactwo do FDG, przy czym szczególnie problematyczne jest zdiagnozowanie nowotworu prostaty. (L. K. Griffeth: Use of PET/CT scanning in cancer patients: technical and practical considerations).

Zastosowanie cząsteczki chelatora umożliwia wiązanie jonów różnych pierwiastków promieniotwórczych. Radioizotopy przechowywane w generatorach (średnia długość przydatności generatora to około 2 tyg.) mogą być wiązane przez nośnik z cząsteczką chelatora bezpośrednio przed podaniem znacznika do pacjenta. Możliwe dzięki temu jest kilka zastosowań wynalazku poprzez wiązanie izotopów o rozpadzie beta plus – do diagnostyki PET, beta minus – do terapii oraz emiterów gamma do diagnostyki SPECT lub izotopów ulegających rozpadowi alfa – służących terapii.

Obecnie znane znaczniki dedykowane diagnostyce PET to głównie małe związki posiadające w swojej strukturze jeden atom radioaktywny – ¹⁸F-fluorodeoksyglukoza (FDG), cholina znakowana węglem ¹¹C, ¹¹C-metionina oraz ¹¹C-octan.

Znane są połączenia takich polisacharydów jak dekstran z chelatorami poprzez cząsteczki lizyny. Utworzone są w ten sposób zmodyfikowane łańcuchy dekstranu – pierwotnie utleniane do grup aldehydowych, następnie przyłączana jest lizyna przez grupę aminową oraz kolejno przez aktywny ester NHS (N-hydroksysukcynoimidu) dołączana jest cząsteczka chelatora. Najbardziej rozpowszechnionym diagnostykiem wykorzystującym radioizotop do diagnostyki PET jest wspomniana ¹⁸F-fluorodeoksyglukoza (FDG). Izotop fluoru ¹⁸F charakteryzuje się szeregiem zalet m.in. całkowicie nietoksycznymi produktami rozpadu promieniotwórczego. Ograniczeniem jest natomiast krótki czas półtrwania izotopu (110 min), co stanowi wyzwanie logistyczne oraz specyficzne wymogi czasu produkcji oraz kontroli jakości. Znane są również połączenia dwóch molekuł: czynnika celującego oraz cząsteczki chelatora. Jako czynnik celujący mogą być wykorzystywane przeciwciała lub krótkie peptydy.

Z patentu PL221351 znany jest sposób wytwarzania nanocząstek polisacharydowych poprzez utlenianie dekstranu za pomocą nadjodanu, a następnie do tak wytworzonych grup aldehydowych przyłączanie mono-amin alifatycznych (lipofilowych).

Z publikacji WO9118020 znana jest struktura składająca się z centralnego rdzenia, polisacharydowego łącznika przyłączonego do rdzenia oraz specyficznej cząsteczki przyłączonej do polisacharydu. Rdzeń korzystnie stanowi albumina. Polisacharydem korzystnie jest dekstran. W korzystnej procedurze łańcuch polisacharydowy jest wstępnie utleniany w celu uzyskania grup aldehydowych, np. nadjodanem, a następnie po iminowaniu powstałego polialdehydodekstranu jest poddawany redukcji. Do tak przygotowanego dekstranu przyłącza się radioizotop, bezpośrednio lub za pośrednictwem chelatora znajdującego się w albuminowych mikrosferach, które są zmodyfikowane bezwodnikiem bursztynowym, po czym przyłączany jest dihydrazyd. Grupy hydrazydowe reagują z kolei z grupami CHO utlenionego dekstranu.

Z publikacji WO0115746 znany jest radiofarmaceutyk zawierający polisacharyd wyposażony w grupy sekwestrujące przyłączone do łańcucha polisacharydu za pomocą wiązań kowalencyjnych, przy czym te grupy są wybrane spośród $R-NH-$, $R-N=$ i $R(R_1)N-N$, zaś R jest grupą węglowodorową lub grupą aromatyczną z co najmniej jednym atomem siarki, a R_1 jest atomem wodoru lub grupą metylową. Te przyłączone grupy, razem z metalem radioaktywnym, tworzą kompleks typu chelatu. Preparat ma formę mikrocząstek o rozmiarze 0,01–100 μm . Preparat może mieć formę roztworu lub być w postaci liofilizowanej.

Sposób otrzymywania preparatu polega na tym, że polisacharyd utlenia się za pomocą nadjodanu, poddaje się utleniony polisacharyd reakcji ze związkiem posiadającym grupę aminową lub hydrazynową, następnie opcjonalnie redukuje się za pomocą borowodoru sodu, po czym poddaje się tak sfunkcjonalizowany polisacharyd reakcji z solą metalu radioaktywnego.

W toku prowadzonych badań okazało się, że przyłączenie lipofilowej diaminy również pozwala na otrzymywanie nanocząstek. Ponadto, tak otrzymane nanocząstki są bardziej stabilne, ze względu na łączenie różnych grup aldehydowych do jednej diaminy, dzięki obecności dwu grup aktywnych – dwu reszt aminowych. Dodatkowym pozytywnym efektem zastosowania diaminy, jest możliwość dołączenia do wolnej grupy aminowej (jeśli nie została ona przyłączona do grupy aldehydowej) czynnika chelatującego z wykorzystaniem wiązania amidowego. Dzięki dołączonemu czynnikowi chelatującemu nanocząstka zyskuje możliwość wiązania atomów pierwiastków promieniotwórczych i przez to może być wykorzystywana w diagnostyce medycznej.

Celem wynalazku jest dostarczenie trwałych i stabilnych nanocząstek polimerowych chelatujących izotopy promieniotwórcze, zapewniających stabilność radiochemiczną oraz dłuższe przebywanie znacznika w tkance nowotworowej oraz wysoki współczynnik zawartości guz/krew.

Celem wynalazku jest też dostarczenie sposobu wytwarzania nanocząstek umożliwiającego przeprowadzenie szybkiej i prostej procedury znakowania. Zastosowanie cząsteczki chelatora w nanocząstce polimerowej umożliwia wiązanie radioizotopów wmywanych z generatora – bez konieczności bezpośredniego dostępu do cyklotronu lub reaktora jądrowego.

Wynalazek znajduje zastosowanie do celów zarówno diagnostycznych, jak i terapeutycznych. Cząsteczka chelatora jest zdolna do wiązania różnych radioizotopów, o różnym mechanizmie rozpadu oraz innej energii emitowanego promieniowania. Dzięki temu, zmiana rodzaju radioizotopu umożliwia stosowanie nanocząstek polimerowych do diagnostyki oraz terapii. Diagnostyka może wykorzystywać różne dostępne metody: PET, SCEPT, MR oraz ich hybrydy np. PET/MR.

Przedmiot wynalazku stanowi sposób wytwarzania nanocząstek polimerowych chelatujących izotopy promieniotwórcze, ewentualnie z powierzchnią zmodyfikowaną specyficznymi molekułami kierującymi do określonego rodzaju komórek nowotworowych. Wynalazek obejmuje także nanocząstki wytworzone zastrzeżanym sposobem oraz ich zastosowanie.

Sposób wytwarzania znakowanych radiochemicznie nanocząstek polimerowych chelatujących izotopy promieniotwórcze, ewentualnie z powierzchnią zmodyfikowaną specyficznymi molekułami kierującymi do określonego rodzaju komórek nowotworowych i/lub nowotworowej przestrzeni międzykomórkowej, umożliwiający ich przechowywanie, obejmuje etapy, w których:

- a) łańcuch polimeru wybranego spośród polisacharydów: dekstranu, kwasu hialuronowego, celulozy oraz jej pochodnych utlenia się do polialdehydu za pomocą nadjodanu,
- b) przyłącza się aminy jako czynnik zwijający, gdzie aminy oznaczają diaminy lub wieloaminy o charakterze hydrofobowym lub hydrofilowym, jak również diaminy lub wieloaminy zawierające

grupy aminowe polietylenoglikole, polipropylenoglikole, polietylenoiminy albo krótkie blok-blok polimery, przy czym reakcji może ulegać jedna lub więcej grup aminowych.

- c) powstałe wiązania iminowe redukuje się do wiązania aminowego,
- d) do wolnej pierwszorzędowej grupy aminowej przyłączonej w b) aminy przyłącza się poprzez wiązanie amidowe cząsteczkę chelatora,
- e) oczyszcza się formulację,
- f) frakcję nanocząstek poddaje się liofilizacji,
- g) prowadzi się znakowanie radiochemiczne nanocząstek izotopami metali promieniotwórczych.

Zgodnie ze sposobem według wynalazku przed oczyszczeniem formulacji korzystnie dodaje się etap modyfikacji powierzchni nanocząstek, w którym grupy aldehydowe zastępuje się grupami karboksylowymi poprzez ich utlenienie za pomocą wody bromowej do grup karboksylowych lub w którym prowadzi się reakcję pozostałych wolnych grup aminowych z kwasem glutaminowym, bezwodnikiem bursztynowym lub kwasem chloctowym.

Korzystnie, przed oczyszczeniem formulacji dodaje się etap modyfikacji powierzchni nanocząstek, w którym do wolnych grup aminowych przyłącza się cząstki celujące do określonych receptorów w tkankach. Cząstki celujące są wybrane z grupy obejmującej kwas foliowy, oligopeptydy, nukleotydy lub ich analogi.

Etap oczyszczania realizuje się poprzez dializę wobec wody lub buforu, i/lub poprzez oczyszczanie na kolumnie chromatograficznej.

Znakowanie radiochemiczne prowadzi się, realizując etapy, w których

- h) rozpuszcza się liofilizat w buforze o pH z zakresu 2–8, korzystnie pH z zakresu 3–5,
- i) dodaje się izotop w postaci soli, zachowując stosunek molowy chelator : izotop w zakresie 1–1000,
- j) roztwór inkubuje się w temperaturze z zakresu 20–100 °C, korzystnie z zakresu 70–100 °C, przy czym najbardziej korzystnie w temperaturze $95 \pm 5^\circ\text{C}$.

Jako chelatory stosuje się pochodne DOTA, DTPA i/lub NOTA.

Znakowanie radiochemiczne prowadzi się izotopami metali wybranymi spośród: Gd, Cu-64, Ga-68, Ga-67, It-90, In-111, Lu-177, Ak-227.

Wynalazek obejmuje także znakowane radiochemicznie nanocząstki polimerowe chelatujące izotopy promieniotwórcze wytworzone sposobem opisanym powyżej, ewentualnie z powierzchnią zmodyfikowaną specyficznymi molekułami kierującymi do określonego rodzaju komórek nowotworowych.

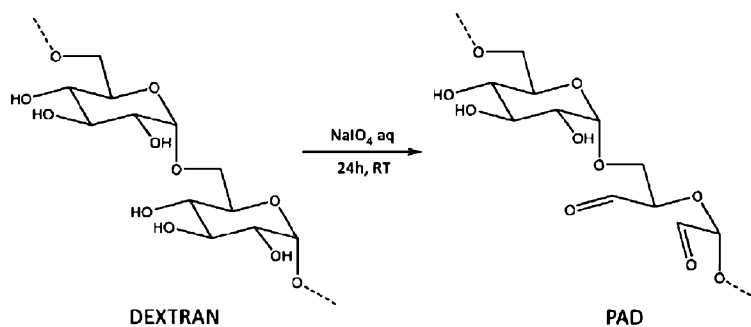
Zakres wynalazku obejmuje również znakowane radiochemicznie nanocząstki polimerowe do zastosowania w diagnostyce Pozytonową Tomografią Emisyjną (PET), PET/MR albo w brachyterapii.

Do otrzymania nanocząstek wykorzystywane są takie polimery jak dekstran, kwas hialuronowy, celuloza oraz jej pochodne. Polimery są wykorzystywane zarówno w formie natywnej, jak i po utlenieniu do grup aldehydowych, a w niektórych przypadkach również do grup karboksylowych.

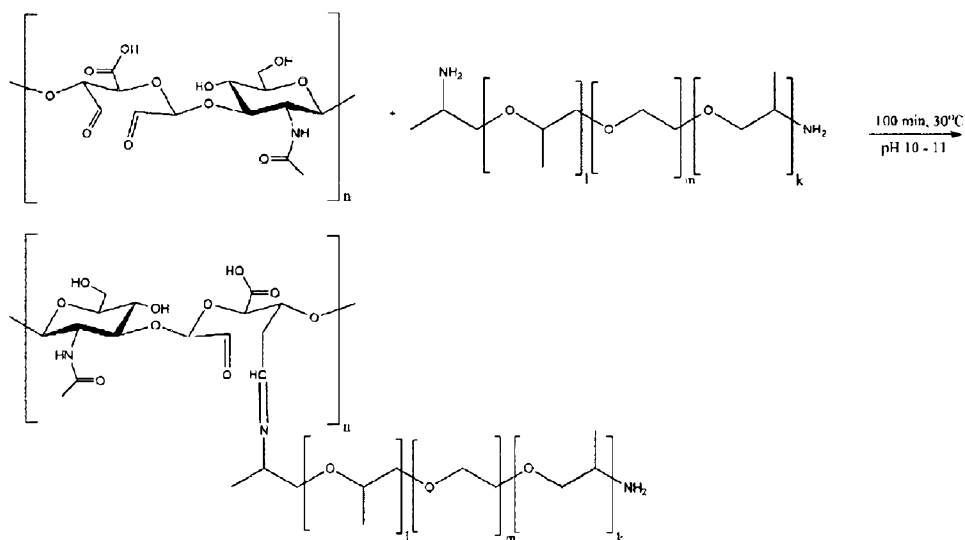
Jako czynniki zwijające wykorzystywane są diaminy lub wieloaminy o charakterze hydrofobowym lub hydrofilowym, jak również zawierające grupy aminowe polietylenoglikole, polipropylenoglikole, polietylenoiminy albo krótkie blok-blok polimery, przy czym reakcji może ulegać jedna lub więcej grup aminowych. Jako czynniki chelatujące wykorzystywane są różne pochodne DOTA, DTPA oraz NOTA, np. DOTA-NHS (monoester kwasu 1,4,7,10-tetraazacyklododekano-1,4,7,10-tetraoctowego i N-hydroksysukcynoimidu), DOTA-butyloaminę (kwas 1,4,7,10-tetraazacyklododekano-1,4,7-trioctowy-10-(4-aminobutylo)acetamid), DOTA-maleimid (kwas 1,4,7,10-tetraazacyklododekano-1,4,7-trioctowy-10-maleimidoetyloacetamid), DOTA-PEG-NT₂ (kwas 2,2',2''-(10-(17-amino-2-okso-6,9,12,15-tetraoksy-3-azaheptadecylo)-1,4,7,10-tetraazacyklododekano-1,4,7-trioctowy), DOTA-SCN (kwas 2-(4-izotiocyanobenzylo)-1,4,7,10-tetraazacyklododekano trioctowy).

Nanocząstki otrzymywane są poprzez chemiczną modyfikację łańcucha polimerowego, a następnie formację dynamicznej struktury miceli na drodze samoorganizacji w środowisku wodnym.

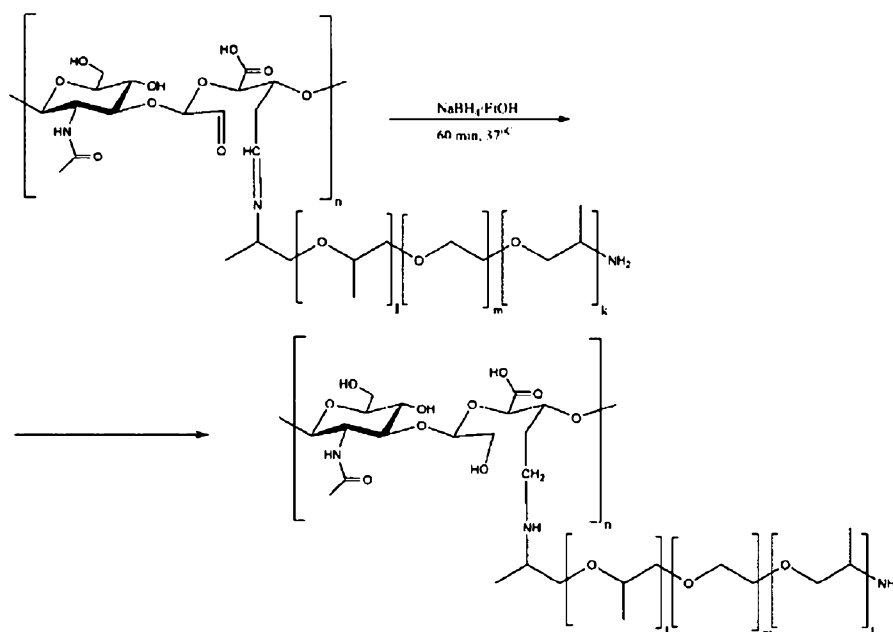
W pierwszym etapie łańcuch polimeru, np. dekstranu, jest utleniany do polialdehydu za pomocą nadjodanu sodu.



W kolejnym etapie zostają przyłączone łańcuchy, takie jak diaminy lub wieloaminy o charakterze hydrofobowym lub hydrofilowym, jak również zawierające grupy aminowe polietylenoglikole, polipropylenoglikole, polietyleniminy albo krótkie blok-blok polimery. Dodatkowo, grupy aldehydowe mogą zostać następnie utlenione za pomocą wody bromowej do grup karboksylowych lub prowadzi się reakcję pozostałych wolnych grup aminowych z kwasem glutaminowym, bezwodnikiem bursztynowym lub kwasem chlooctowym.



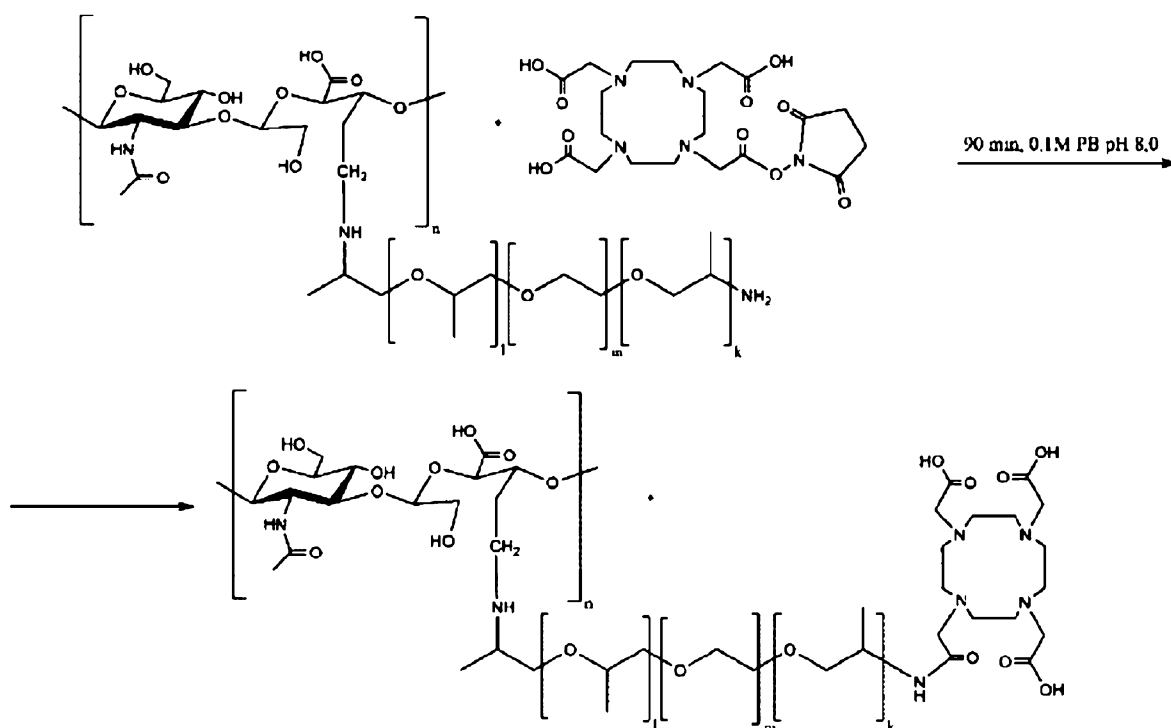
Następnie prowadzi się redukcję:



Reakcja prowadzona jest w temperaturze 25–65°C oraz w pH 9,1–13 przez 30–120 min. Po zakończeniu reakcji odczyn mieszaniny poreakcyjnej doprowadzany jest do pH 7,4 odpowiadającemu pH fizjologicznemu. Utworzone w wyniku reakcji iminowania wiązanie iminowe jest redukowane z użyciem roztworu borowodorku w etanolu. Borowodorek może być borowodorkiem sodu lub potasu. Reakcja redukcji prowadzona jest przez 60 min w temperaturze 37°C. Po zakończeniu redukcji, pH reakcji ponownie ustalane jest na 7,4.

W przypadku reakcji z grupami karboksylowymi (np. reakcja z natywną postacią kwasu hialuronowego) stosuje się czynniki sprzęgające, np. EDC HCl (chlorowodorek 1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropylo)karbodiimidu). Umożliwiają one w łagodnych warunkach amidowanie grup karboksylowych w obecności pierwszorzędowych amin.

Przyłączenie cząsteczki chelatora może być realizowane zależnie od wybranej pochodnej: np. ester N-hydroksysukcynoimidu (NHS), izotiocyanian (SCN), które reagują z grupami aminowymi lub pochodne aminowe (NH₂), które reagują z grupami aldehydowymi. Przykładową reakcję przyłączania grupy chelatującej ilustruje schemat:



Kluczowym etapem przygotowania produktu gotowego do znakowania jest oczyszczenie formulacji. Opracowano dwie metody oczyszczania otrzymanych nanocząstek: poprzez dializę i/lub na kolumnie chromatograficznej. Dializę prowadzi się wobec wody lub odpowiedniego buforu w czasie 12–72 h, korzystnie 24–48 h, z częstą wymianą płynu. Stosunek objętościowy płynu zewnętrznego do próbki oczyszczanej wynosi 20 : 1–200 : 1, korzystnie 100 : 1. Po przyłączeniu cząsteczki chelatora mieszaninę poreakcyjną oczyszcza się wobec buforu octowego o pH 5,0. Po przyłączeniu cząsteczki FA mieszaninę poreakcyjną oczyszcza się wobec buforu fosforanowego pH 7,4.

Oczyszczanie na kolumnie prowadzi się, stosując kolumnę z wypełnieniem Sephadex, przy czym, po wprowadzeniu nanocząstek na kolumnę i elucji buforem, analizuje się zebrane frakcje na obecność cukrów redukujących oraz chelatora.

Nanocząstki poddawane są następnie procesowi liofilizacji, co umożliwia ich przechowywanie w postaci suchej pianki przez okres min. 3 miesięcy. Nanocząstki po ponownym uwodnieniu reorganizują się w ok. 20 minut poprzez łagodne mieszanie w docelowym buforze.

Końcowym etapem przygotowania radiofarmaceutyku jest znakowanie radiochemiczne oraz badanie stabilności wyznakowanego preparatu w buforze oraz serum. Zależnie od formulacji oraz składu chemicznego nanocząstek, procedury znakowania mogą różnić się nieznacznie rodzajem buforu oraz czasem kompleksowania radioizotopu przez cząsteczkę chelatora.

Znakowanie Lutetem-177

Znakowanie z użyciem lutetu-177 prowadzi się w następujący sposób:

- nanocząstki rozpuszcza się w roztworze soli sodowej kwasu askorbinowego o pH = 4,5, otrzymując stężenie 1–2 mg/ml,
- dodaje się lutet-177 tak, aby zachować stosunek molowy chelatora DOTA : Lu pomiędzy 1–2,5,
- następnie roztwór inkubuje się 15 minut w $95 \pm 5^\circ\text{C}$,
- aktywność dodanego lutetu powinna zapewnić otrzymanie kompleksu o aktywności właściwej 300–700 MBq/mg.

Znakowanie Itrem-90

Znakowanie z użyciem itru-90 prowadzi się w następujący sposób:

- nanocząstki rozpuszcza się w roztworze soli sodowej kwasu askorbinowego o pH = 4,5, otrzymując stężenie 1–2 mg/ml,
- dodaje się itr-90 tak, aby zachować stosunek molowy DOTA : Y pomiędzy 1–4,
- następnie roztwór inkubuje się 15 minut w $95 \pm 5^\circ\text{C}$,
- aktywność dodanego itru powinna zapewnić otrzymanie kompleksu o aktywności właściwej 300–1500 MBq/mg.

Znakowanie Indem-111

Znakowanie z użyciem Indu-111 prowadzi się w następujący sposób:

- nanocząstki rozpuszcza się w buforze octanu amonu 0,25 M o pH = 5,4, otrzymując stężenie 15 mg/ml,
- dodaje się Ind-111 tak, aby zachować stosunek molowy DOTA : In pomiędzy 1–4,
- następnie roztwór inkubuje się 15 minut w 70°C ,
- dodaje się 1 mM roztworu EDTA (kwas (etylenodiamino)tetraoctowy) (2 μl) oraz inkubuje próbkę w temperaturze pokojowej przez 5 min,
- aktywność dodanego indu powinna zapewnić otrzymanie kompleksu o aktywności właściwej 300–1500 MBq/mg.

Kontrola jakości radiochemicznej

Sprawdzenie czystości radiochemicznej prowadzi się, stosując metodę chromatografii cienkowarstwowej (TLC), w następujących warunkach:

- faza ruchoma – 0,1 M bufor cytrynianowy pH = 5,0,
- faza stacjonarna – ITLC-SG,
 - wymiary pasków 12 x 1,5 cm
 - miejsce naniesienia: 1,5 cm ($R_f = 0$),
 - miejsce zakończenia rozwijania 10 cm ($R_f = 1$),
- wielkość nanoszonych próbek 2–5 μl ,
- przed naniesieniem na paski próbkę badaną miesza się z 10 mM roztworem DTPA w stosunku objętościowym 1 : 1 obj./obj. w celu wyeliminowania niespecyficznego wiązania radioizotopu metalu,
- po rozwinięciu paski suszy się, a następnie oblicza rozkład radioaktywności przy użyciu odpowiedniego detektora radiometrycznego,
- interpretacja wyników:
 - $R_f = 0,0$ – $0,1$ dla wyznakowanych nanocząstek,
 - $R_f = 0,4$ – $0,6$ dla wyznakowanej niezwiązanej cząsteczki chelatora DOTA,
 - $R_f = 0,9$ – $1,0$ dla wolnego radioizotopu metalu.

Figury rysunku załączone do opisu mające na celu zobrazowanie wynalazku przedstawiają:

Fig. 1 – Obraz rozwiniętej płytki ITLC-SG z Przykładu 1 dla nanocząstek z kwasu hialuronowego znakowanych Itrem-90 i Lutetem-177.

Fig. 2 – Obraz rozwiniętej płytki ITLC-SG z Przykładu 2 dla nanocząstek dekstranowych z przyłączoną polieterodiaminą oraz kwasem foliowym znakowanych Itrem-90.

Fig. 3 – Obraz rozwiniętej płytki ITLC-SG z Przykładu 3 dotyczącego stanu techniki dla nanocząstek dekstranowych z przyłączoną dodecylaminą oraz diaminodekanem znakowanych Indem-111.

Fig. 4 – Obraz rozwiniętej płytki ITLC-SG z Przykładu 4 dla nanocząstek dekstranowych z przyłączoną polietylenoiminą znakowanych Lutetem-177.

Fig. 5 – Profil stężenia wyznakowanych Indem-111 cząstek we krwi w czasie 5 min, 30 min, 1 h, 4 h, 6 h, 24 h, oraz 48 h.

Przedmiot wynalazku został zilustrowany w korzystnych przykładach jego realizacji opisanych poniżej.

Przykład 1

Nanocząstki z kwasu hialuronowego znakowane Itrm-90 lub Lutetem-177

Utlanianie kwasu hialuronowego do polialdehydohialuronianu (PAHA):

2,5 g hialuronianu sodu rozpuszczono w 125 ml wody ultraczystej (2% roztwór wag./obj.). Po otrzymaniu klarownego roztworu dodano 427 mg nadjodanu sodu. Reakcję prowadzono przez 12 h w ciemności oraz w temperaturze pokojowej. Otrzymany produkt (poliadehydohialuronian PAHA) oczyszczono przez dializę wobec wody prowadzoną przez 72 godziny, z co najmniej dwukrotną wymianą wody w ciągu 24 godzin. Finalny produkt suszono w 40°C.

Synteza nanocząstek PAHA – Jeffamine:

Nanocząstki otrzymano poprzez modyfikację utlenionego łańcucha hialuronianu. Przygotowano 2% roztwór PAHA: rozpuszczono 510,35 mg wysuszonego produktu w 25,5 ml ultraczystej wody. Mieszano w temperaturze pokojowej.

Przygotowano 20% roztwór Jeffamine® ED600 firmy Merck [O,O'-Bis(2-aminopropyl) polipropylene glikol-blok-polietyleno glikol-blok-polipropylene glikol] poprzez rozpuszczenie 2 g w 10 ml ultraczystej wody oraz mieszanie w temperaturze pokojowej.

Do roztworu PAHA dodano 1,64 ml roztworu Jeffaminy, po czym doprowadzono pH roztworu do 11 za pomocą 0,5 M NaOH. Reakcję mieszano przez 100 minut w temperaturze 30°C, a pH mieszaniny reakcyjnej reakcji kontrolowano co 20 min. Po tym czasie pH obniżono do wartości fizjologicznej 7,4 przy użyciu 0,5 M HCl.

Redukcja wiązania iminowego:

Przygotowano świeży roztwór borowodorku sodu poprzez rozpuszczenie 100 mg NaBH₄ w 10 ml absolutnego etanolu.

Po zakończeniu reakcji sprzęgania do mieszaniny reakcyjnej dodano 4,55 ml roztworu borowodorku oraz reakcję prowadzono w temperaturze 37°C przez 60 minut. Gotowy produkt zneutralizowano, obniżając pH do 7,4 a następnie oczyszczono poprzez dializę wobec ultraczystej wody przez 24 godziny, zmieniając wodę trzykrotnie. Tak oczyszczone nanocząstki poddano procesowi liofilizacji.

Przyłączanie cząsteczki chelatora:

Rozpuszczono 100 mg nanocząstek PAHA-Jeffamine w 2 ml 0,1 buforu fosforanowego pH 8,0 i mieszało do całkowitego rozpuszczenia. Odważono 18 mg DOTA-NHS oraz rozpuszczono w 1 ml buforu fosforanowego. Dodano roztwór nanocząstek do roztworu chelatora i prowadzono reakcję w temperaturze 4°C przez 90 min. Końcowy produkt oczyszczono przez dializę wobec 0,1 M buforu octowego o pH 5,0 przez 24 h, zmieniając bufor trzykrotnie. Końcowy produkt poddano liofilizacji i przechowywano w temperaturze -20°C.

Znakowanie radiochemiczne chlorkiem Itru-90 lub chlorkiem Lutetu-177

Odważono 2 mg nanocząstek w postaci liofilizatu i rozpuszczono w 500 µl buforu kwasu askorbinowego. Delikatnie wymieszano do całkowitego rozpuszczenia nanocząstek. Dodano chlorek Itru-90 lub chlorek Lutetu-177 w stosunku molowym 1 : 20 (izotop: DOTA) oraz inkubowano mieszaninę przez 15 min w temperaturze 95°C.

Przygotowanie buforu kwasu askorbinowego:

Rozpuszczono 2,5 g kwasu askorbinowego w 40 ml wody ultraczystej. Dodano 1 ml 30% wodorotlenku sodu oraz uzupełniono objętość do 50 ml ultraczystą wodą.

Określenie wydajności znakowania oraz czystości radiochemicznej

Zmieszano 10 µl wyznakowanej próbki z 10 µl 10 mM roztworu DTPA. Inkubowano przez 5 min. w temperaturze pokojowej. Na wysuszone uprzednio (100°C) płytki ITLC-SG nałożono 5 µl otrzymanego roztworu. Płytki rozwinięto w 0,1 M buforze kwasu cytrynowego / cytrynianu sodu o pH 5,2. Płytki następnie wysuszono w temperaturze 100°C i sprawdzono wydajność znakowania przy pomocy Perkin Elmer Cyclone Plus. Odczyt płytki wg rf:

nanocząstki	rf: 0,0–0,1
niezwiązana DOTA	rf: 0,6–0,7
niezwiązany izotop rf:	0,9–1,0

Obraz rozwiniętej płytki ITLC-SG przedstawiono na Fig. 1.

Przykład 2

Nanocząstki dekstranowe z przyłączoną polieterodiaminą oraz kwasem foliowym (jako specyficzną molekułą kierującą do nowotworu) znakowane Itrm-90

Synteza nanocząstek: 80% Jeffamine-PAD 70kDa:

Polialdehydodekstran (PAD 0089 7,3% utl., 2000 mg) rozpuszczono w wodzie do stężenia 10% wag./obj. (20 ml).

Czynnik zwijający – Jeffamine ED600 (865 mg) rozpuszczono w wodzie do stężenia 10% wag./obj. (8,65 ml). Oba substraty zmieszano, następnie podniesiono pH mieszaniny reakcyjnej do 11 za pomocą 0,1 M NaOH. Reakcję prowadzono 100 minut, mieszając, w temperaturze 30°C, utrzymując pH na poziomie 11. Po upływie 100 minut, pH mieszaniny reakcyjnej doprowadzono do 7,4 za pomocą 0,1 M HCl.

Redukcja wiązania iminowego:

Borowodorek sodu (16,4 mg) rozpuszczono w bezwodnym etanolu do stężenia 1% wag./obj. (1,64 ml). Tak przygotowany substrat dodano do mieszaniny poreakcyjnej nanocząstek z przyłączonym czynnikiem zwijającym. Reakcję prowadzono w 37°C, mieszając przez 60 minut. Po upływie tego czasu pH reakcji doprowadzono do 7,4, używając 0,1 M HCl. Mieszaninę poreakcyjną dializowano 24 h wobec wody, zmieniając wodę trzykrotnie w trakcie trwania procesu. Tak oczyszczone nanocząstki poddano procesowi liofilizacji.

Przyłączanie cząsteczki chelatora:

Zliofilizowane nanocząstki (300 mg) rozpuszczono w buforze fosforanowym pH = 8,0 w stężeniu 5% (6 ml). Pochodną chelatora – DOTA-NHS (78 mg) zawieszono w buforze fosforanowym o pH = 8,0 w stężeniu 33% (0,234 ml). Po zmieszaniu reagentów reakcję prowadzono 90 minut w temperaturze pokojowej, mieszając na mieszadle magnetycznym. Po zakończeniu reakcji, mieszaninę poreakcyjną dializowano wobec buforu octanowego pH = 5,0 przez 24 h, zmieniając bufor dializacyjny trzykrotnie w trakcie trwania procesu. Tak oczyszczone nanocząstki z przyłączonym chelatorem poddano procesowi liofilizacji.

Synteza nanocząstek PAD-FA

Kwas foliowy (FA) był przyłączany do nanocząstek skoniugowanych z odpowiednim chelatorem za pomocą sprzęgania grupy aminowej zwijacza z aktywowaną formą estrową kwasu foliowego i N-hydroksysukcynoimidu (FA-NHS).

Nanocząstki (100 mg) rozpuszczono w 0,1 M buforze fosforanowym o pH = 8,00 do stężenia 5% wag./obj. (2 ml), natomiast pochodną kwasu foliowego (35 mg) rozpuszczono w DMSO, tak aby zawartość fazy organicznej do nieorganicznej nie przekroczyła 20% (0,4 ml). Po powolnym wkropleniu kwasu foliowego syntezę prowadzono 2 h w temperaturze pokojowej. Po zakończeniu reakcji mieszaninę poreakcyjną dializowano 24 h do 0,1 M buforu fosforanowego pH-7,4, zmieniając trzykrotnie bufor w trakcie trwania procesu.

Znakowanie radiochemiczne chlorkiem Itru-90

Odważono 2,5 mg nanocząstek w postaci liofilizatu i rozpuszczono w 250 µl 0,1 M buforu fosforanowego o pH 5,8 z dodatkiem 1% Tween. Delikatnie wymieszano do całkowitego rozpuszczenia nanocząstek. Dodano chlorek Itru-90 w stosunku molowym 1 : 2000 (izotop : DOTA) i inkubowano mieszaninę przez 15 min w temperaturze 100°C. Po inkubacji odczekano 10 min., a następnie zrobiono analizę ITLC-SG.

Określenie wydajności znakowania oraz czystości radiochemicznej

Nałożono 5 µl otrzymanego roztworu na wysuszone uprzednio (100°C) płytki ITLC-SG. Płytki rozwinęto w 0,1 M buforze kwasu cytrynowego / cytrynianu sodu w pH 5,2. Następnie wysuszono płytki w temperaturze 100°C i sprawdzono wydajność znakowania przy pomocy Perkin Elmer Cyclone Plus. Odczyt płytki wg rf:

nanocząstki	rf:	0,0–0,1
niezwiązana DOTA	rf:	0,6–0,7
niezwiązany izotop	rf:	0,9–1,0

Obraz rozwiniętej płytki ITLC-SG przedstawiono na Fig. 2.

Przykład 3 – stan techniki służący lepszemu zrozumieniu wynalazku

Nanocząstki dekstranowe z przyłączoną dodecylaminą oraz diaminodekanem znakowane Indem-111

Synteza nanocząstek: 60% Dodecyloamina, 20% Diaminodekan PAD 70 kDa

Polialdehydodekstran (PAD 0255 3,9% utl., 1600 mg) rozpuszczono w wodzie do stężenia 10% wag./obj. (16,00 ml).

Czynnik zwijający – dodecyloaminę (102 mg) rozpuszczono w wodzie do stężenia 2% wag./obj. (5,1 ml). Oba substraty zmieszano, podniesiono pH mieszaniny reakcyjnej do 10, poprzez powolne wkraplanie 0,1 M roztworu NaOH. Reakcję prowadzono 60 minut, mieszając w temperaturze 30°C, utrzymując pH na poziomie 10. Po upływie 60 minut dodano 2% roztwór wodny diaminodekanu (37 mg, 1,85 ml), po czym pH reakcji doprowadzono ponownie do 10 za pomocą 0,1 M NaOH. Reakcję prowadzono, mieszając w temperaturze 30°C, utrzymując pH na poziomie 10. Po upływie 60 minut pH mieszaniny reakcyjnej doprowadzono do 7,4 za pomocą 0,1 M HCl.

Redukcja wiązania iminowego:

Borowodorek sodu (58 mg) rozpuszczono w bezwodnym etanolu w stężeniu 1% wag./obj. (5,80 ml). Tak przygotowany roztwór dodano do mieszaniny poreakcyjnej nanocząstek z przyłączonymi czynnikami zwijającymi. Reakcję prowadzono w 37°C, mieszając przez 60 minut. Po upływie tego czasu pH mieszaniny reakcyjnej doprowadzono do 7,4, używając 0,1 M HCl. Mieszaninę poreakcyjną dializowano 24 h wobec wody, zmieniając wodę trzykrotnie w trakcie trwania procesu. Tak oczyszczone nanocząstki poddano procesowi liofilizacji.

Przyłączanie cząsteczki chelatora:

Zliofilizowane nanocząstki (204 mg) rozpuszczono w buforze fosforanowym o pH = 8,0 do stężenia 5% (4,08 ml). Pochodną chelatora – DOTA-NHS (30 mg) zawieszono w buforze fosforanowym o pH = 8,0 do stężenia 33% (0,09 ml). Po zmieszaniu reagentów reakcję prowadzono 90 minut w temperaturze pokojowej, mieszając na mieszadle magnetycznym. Po zakończeniu reakcji, mieszaninę poreakcyjną oczyszczano od nieprzereagowanych substratów za pomocą rozdziału chromatograficznego na kolumnie z wypełnieniem żelom typem Sephadex (G-25), stosując 0,01 M bufor octanowy o pH = 5,1 jako eluent. Tak oczyszczone nanocząstki z przyłączonym chelatorem poddano procesowi liofilizacji.

Znakowanie radiochemiczne chlorkiem Indu-111

Do probówki eppendorfa o poj. 1,5 ml dodano 40,3 µl roztworu Indu-111 w 0,5 NHCl (555 µCi), 100 µg nanocząstek oraz 8 µl 0,3 M octanu amonu o pH 5,4. Próbkę inkubowano przez 15 min w temperaturze 70°C, a następnie niezwiązany izotop usunięto poprzez dodatek 1 mM EDTA (2 µl) i inkubowano przez 5 min w temperaturze pokojowej. Po inkubacji odczekano 10 min, a następnie wykonano analizę ITLC-SG.

Określenie wydajności znakowania oraz czystości radiochemicznej:

Na wysuszone uprzednio (100°C) płytki ITLC-SG nałożono 5 µl otrzymanego roztworu. Płytkę rozwinięto w 0,1 M buforze kwasu cytrynowego/ cytrynianu sodu o pH 5,0. Następnie wysuszone płytki w temperaturze 100°C i sprawdzono wydajność znakowania. Określono zakresy:

nanocząstki	rf: 0,0–0,1
kompleks niezwiązany DOTA-izotop	rf: 0,6–0,7
kompleks niezwiązany izotop-EDTA	rf: 0,9–1,0

Obraz rozwiniętej płytki ITLC-SG przedstawiono na Fig. 3.

P r z y k ł a d 4

Nanocząstki dekstranowe z przyłączoną polietylenoiminą znakowane Lutetem-177

Przyłączenie chelatora do polietylenoiminy:

Przygotowano 5% wag./obj. roztwór czynnika zwijającego – rozgałęzionej polietylenoiminy (MW 10 kDa) – w 0,1 M buforze fosforanowym pH 8,0. W tym celu odważono 463 mg czynnika zwijającego, który rozpuszczono w 9,27 ml buforu.

Chelator łączono z grupami aminowymi czynnika zwijającego w różnym stopniu (5%, 10%, 25% oraz 40% podstawienia). Dla każdego podstawienia stosowano w reakcji dwukrotny nadmiar chelatora w stosunku do założonego podstawienia.

Przygotowano 5% wag./obj. roztwór chelatora – DOTA-NHS – w 0,1 M buforze fosforanowym pH 8,0. W tym celu dla podstawienia chelatorem wynoszącego 5% rozpuszczono 1,09 mg DOTA-NHS w 29,5 µl buforu. Dla kolejnych wariantów podstawienia chelatorem czynnika zwijającego przygotowano roztwór chelatora w sposób następujący:

- podstawienie 10% chelatorem – 2,18 mg DOTA-NHS w 59 µl buforu fosforanowego pH 8,0

- podstawienie 25% chelatorem – 5,45 mg DOTA-NHS w 147,5 µl buforu fosforanowego pH 8,0
- podstawienie 40% chelatorem – 8,72 mg DOTA-NHS w 236 µl buforu fosforanowego pH 8,0.

Roztwór 5% wag./obj. czynnika zwijającego dodano do każdej z próbek z chelatorem w takiej samej ilości 57,4 µl (2,87 mg). Reakcje prowadzono w temperaturze pokojowej, mieszając przez 90 min.

Synteza nanocząstek, przyłączenie polialdehydodekstranu:

402 mg polialdehydodekstranu (PAD 0137 100,2 grup CHO/mol) rozpuszczono w wodzie, uzyskując stężenie 5% wag./obj. (8,05 ml). Po 100 mg polialdehydodekstranu w roztworze 5% wag./obj. połączono z odpowiednimi mieszaninami reakcyjnymi zawierającymi czynnik zwijający z przyłączonym chelatorem. Reakcje prowadzono przez 100 min. w temperaturze 30°C, pH reakcji utrzymywano na poziomie 11, używając 0,5 M NaOH.

Redukcja wiązania iminowego:

Borowodorek sodu (10,872 mg) rozpuszczono w bezwodnym etanolu do stężenia 3% wag./obj. (0,362 ml). Tak przygotowany substrat dodano do mieszaniny poreakcyjnej nanocząstek z przyłączonym czynnikiem zwijającym i chelatorem. Reakcję prowadzono w 37°C, mieszając przez 60 minut. Po upływie tego czasu pH reakcji doprowadzono do 7,4, używając 0,1 M HCl. Mieszaninę poreakcyjną dializowano 72 h wobec 10 mM buforu octanowego pH 5,0, zmieniając wodę dwukrotnie w trakcie każdego 24 h procesu. Tak oczyszczone nanocząstki poddano procesowi liofilizacji.

Znakowanie radiochemiczne chlorkiem Lutetu-177:

Odważono 0,9 mg nanocząstek w postaci liofilizatu i rozpuszczono w 510 µl buforu kwasu askorbinowego o pH 4,5. Delikatnie wymieszano do całkowitego rozpuszczenia nanocząstek. Dodano chlorek Lutetu-177 w stosunku molowym 1 : 8 (izotop : DOTA) i inkubowano mieszaninę przez 15 min w temperaturze 95 ± 5°C. Po inkubacji odczekano 15 min a następnie wykonano analizę ITLC-SG.

Przygotowanie buforu kwasu askorbinowego:

Rozpuszczono 2,5 g kwasu askorbinowego w 40 ml ultraczystej wody. Dodano 1 ml 30% wodorotlenku sodu i uzupełniono objętość do 50 ml ultraczystą wodą. Bufor może być przez krótki czas przechowywany w 4°C.

Określenie wydajności znakowania oraz czystości radiochemicznej:

Na wysuszone uprzednio (100°C) płytki ITLC-SG nałożono 5 µl otrzymanego roztworu. Płytki rozwinęto w 0,1 M buforze kwasu cytrynowego / cytrynianu sodu o pH 5,2. Płytki następnie wysuszono w temperaturze 100°C i sprawdzono wydajność znakowania przy pomocy Perkin Elmer Cyclone Plus. Odczyt płytki wg rf:

nanocząstki	rf: 0,0–0,1
niezwiązana DOTA	rf: 0,6–0,7
niezwiązany izotop	rf: 0,9–1,0

Obraz rozwinętej płytki ITLC-SG przedstawiono na Fig. 4.

Przykład 5

Badania biodystrybucji nanocząstek dekstranowych na małym modelu zwierzęcym.

Badanie przeprowadzono na myszach nude z zaszczepionym nowotworem jajnika. Nanocząstki nie posiadały dodatkowego czynnika kierującego. Przeprowadzone badania wykazały gromadzenie się nanocząstek w nowotworze wraz z czasem (do 48 h).

Nanocząstki wyznakowano Indem-111, a następnie nanocząstki podano w stężeniu 100 mg/kg dożylnie poprzez żyłę ogonową.

Profil stężenia wyznakowanych cząstek we krwi w czasie 5 min, 30 min, 1 h, 4 h, 6 h, 24 h, oraz 48 h przedstawiono na Fig. 5.

Zaobserwowano wzrost sygnału w guzie w czasie, z jednoczesnym spadkiem sygnałów w określonych organach. W organach związanych z rozkładem polisacharydów (wątroba) zaobserwowano wyższe stężenia nanocząstek.

Procent ID w poszczególnych tkankach (% ID/g) po IV podaniu nanocząstek 111 In-DOTA-DDAC-DAD-Dextran w dawce 100 mg/kg na SK-OV-3 ksegraftach w myszach (wartości przedstawione jako średnia ± SD % ID/g) przedstawiono w Tabeli 1.

	G1-1h	G2-4h	G3-24h	G4-48h
Krew	11,250 ± 0,754	6,627 ± 0,884	0,726 ± 0,128	0,264 ± 0,077
Guz	1,076 ± 0,221	1,424 ± 0,221	1,358 ± 0,305	1,911 ± 0,293
Wątroba	6,004 ± 0,594	10,574 ± 1,291	12,548 ± 2,336	12,638 ± 2,518
Nerki	3,016 ± 0,341	2,046 ± 0,343	1,016 ± 0,074	0,991 ± 0,045
Serce	1,500 ± 0,110	1,163 ± 0,140	0,571 ± 0,044	0,676 ± 0,076
Płuco	2,442 ± 0,276	1,390 ± 0,181	0,610 ± 0,037	0,635 ± 0,042
Śledziona	2,246 ± 0,112	2,738 ± 0,220	6,062 ± 0,538	6,521 ± 0,708
Mózg	0,213 ± 0,039	0,124 ± 0,030	0,030 ± 0,007	0,020 ± 0,003
Tarczyca	1,050 ± 0,027	0,782 ± 0,059	0,730 ± 0,098	0,906 ± 0,010
Żołądek	0,618 ± 0,138	0,469 ± 0,071	0,396 ± 0,063	0,336 ± 0,043
Jelito cienkie	1,480 ± 0,215	0,670 ± 0,091	0,803 ± 0,060	0,664 ± 0,098
Jelito grube	0,296 ± 0,034	1,990 ± 0,190	1,021 ± 0,192	0,962 ± 0,169
Mięśnie szkieletowe	0,278 ± 0,035	0,222 ± 0,031	0,200 ± 0,026	0,190 ± 0,032
Kość udowa	1,163 ± 0,102	0,678 ± 0,110	0,446 ± 0,055	0,512 ± 0,096

Objaśnienie skrótów:

PAHA – kwas polialdehydohialuronowy

DOTA – kwas 1,4,7,10-tetraazacyklododekano-1,4,7,10-tetraoctowy

DTPA – kwas pentetynowy

NOTA – kwas 1,4,7-triazacyklononano-1,4,7-trioctowy

DOTA-NHS – monoester kwasu 1,4,7,10-tetraazacyklododekano-1,4,7,10-tetraoctowego i N-hydroksysukcynoimidu

DOTA-butylamina – kwas 1,4,7,10-tetraazacyklododekano-1,4,7-trioctowy-10-(4-aminobutyl)acetamid

DOTA-maleimid – kwas 1,4,7,10-tetraazacyklododekano-1,4,7-trioctowy-10-maleimidoetyloacetamid

DOTA-SCN – kwas 2-(4-izotiocyjanobenzyl)-1,4,7,10-tetraazacyklododekano trioctowy

DOTA-PEG-NH₂ – (kwas 2,2',2''-(10-(17-amino-2-okso-6,9,12,15-tetraoksy-3-azaheptadecylo)-1,4,7,10-tetraazacyklododekano-1,4,7-trioctowy

DDAC – chlorowodorek dodecyloaminy,

DAD – 1,10-diaminodekan

PET – pozytonowa tomografia emisyjna

PET/MR – pozytonowa tomografia emisyjna oraz rezonans magnetyczny

SPECT – Tomografia emisyjna pojedynczych fotonów

NHS – N-hydroksysukcynoimid

SCN – izotiocyjanian

Jeffamine® O,O'-Bis(2-aminopropyl)polipropyleno glikol-blok-polietyleno glikol-blok-poliipropyleno glikol

ITLC-SG – błyskawiczna chromatografia cienkowarstwowa pokrywana żelą krzemionkowym

EDC HCl – chlorowodorek 1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropyl)karbodiimidu

EDTA – kwas (etylenodiamino)tetraoctowy

TLC – chromatografia cienkowarstwowa

Perkin Elmer Cyclone Plus – komputerowy system radiograficzny firmy Perkin Elmer

FA – kwas foliowy

FA-NHS – ester kwasu foliowego i N-hydroksysukcynoimidu

DMSO – dimetylosulfotlenek

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania znakowanych radiochemicznie nanocząstek polimerowych chelatujących izotopy promieniotwórcze, ewentualnie z powierzchnią zmodyfikowaną specyficznymi molekułami kierującymi do określonego rodzaju komórek nowotworowych i/lub nowotworowej przestrzeni międzykomórkowej, umożliwiające ich przechowywanie, **znamienny tym**, że obejmuje etapy, w których:
 - a) łańcuch polimeru wybranego spośród polisacharydów: dekstranu, kwasu hialuronowego, celulozy oraz jej pochodnych utlenia się do polialdehydu za pomocą nadjodanu,
 - b) przyłącza się aminy jako czynnik zwijający, gdzie aminy oznaczają diaminy lub wieloaminy o charakterze hydrofobowym lub hydrofilowym, jak również diaminy lub wieloaminy zawierające grupy aminowe polietylenoglikole, polipropylenoglikole, polietylenoiminy albo krótkie blok-blok polimery, przy czym reakcji może ulegać jedna lub więcej grup aminowych,
 - c) powstałe wiązania iminowe redukuje się do wiązania aminowego,
 - d) do wolnej grupy aminowej przyłączonej w b) aminy przyłącza się poprzez wiązanie amidowe cząsteczkę chelatora,
 - e) oczyszcza się formulację,
 - f) frakcję nanocząstek poddaje się liofilizacji,
 - g) prowadzi się znakowanie radiochemiczne nanocząstek izotopami metali promieniotwórczych.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że przed oczyszczeniem formulacji dodaje się etap modyfikacji powierzchni nanocząstek, w którym grupy aldehydowe zastępuje się grupami karboksylowymi poprzez ich utlenienie za pomocą wody bromowej do grup karboksylowych lub w którym prowadzi się reakcję pozostałych wolnych grup aminowych z kwasem glutaminowym, bezwodnikiem bursztynowym lub kwasem chloooctowym.
3. Sposób według zastrz. 1 albo 2, **znamienny tym**, że przed oczyszczeniem formulacji dodaje się etap modyfikacji powierzchni nanocząstek, w którym do wolnych grup aminowych przyłącza się cząstki celujące do określonych receptorów w tkankach.
4. Sposób według zastrz. 3, w którym cząsteczki celujące są wybrane z grupy obejmującej kwas foliowy, oligopeptydy, nukleotydy lub ich analogi.
5. Sposób według dowolnego z poprzednich zastrz., **znamienny tym**, że etap oczyszczania realizuje się poprzez dializę wobec wody lub buforu, i/lub poprzez oczyszczanie na kolumnie chromatograficznej.
6. Sposób według dowolnego z poprzednich zastrz., **znamienny tym**, że znakowanie radiochemiczne prowadzi się, realizując etapy, w których
 - h) rozpuszcza się liofilizat w buforze o pH z zakresu 2–8, korzystnie pH z zakresu 3–5,
 - i) dodaje się izotop w postaci soli, zachowując stosunek molowy chelator : izotop w zakresie 1–1000,
 - j) roztwór inkubuje się w temperaturze 20–100°C, korzystnie z zakresu 70–100°C, przy czym najbardziej korzystnie w temperaturze $95 \pm 5^\circ\text{C}$.
7. Sposób według dowolnego z poprzednich zastrz., **znamienny tym**, że jako chelatory stosuje się pochodne DOTA, DTPA i/lub NOTA.
8. Sposób według dowolnego z poprzednich zastrz., **znamienny tym**, że znakowanie radiochemiczne prowadzi się izotopami metali wybranymi spośród: Gd, Cu-64, Ga-68, Ga-67, It-90, In-111, Lu-177, Ak-227.
9. Znakowane radiochemicznie nanocząstki polimerowe chelatujące izotopy promieniotwórcze wytworzone sposobem z zastrz. 1–8, ewentualnie z powierzchnią zmodyfikowaną specyficznymi molekułami kierującymi do określonego rodzaju komórek nowotworowych, do zastosowania w diagnostyce Pozytonową Tomografią Emisyjną PET i PET/MR.

10. Znakowane radiochemicznie nanocząstki polimerowe chelatujące izotopy promieniotwórcze utworzone sposobem z zastrz. 1-8, ewentualnie z powierzchnią zmodyfikowaną specyficznymi molekułami kierującymi do określonego rodzaju komórek nowotworowych, do zastosowania w brachyterapii.

Rysunki

Fig. 1

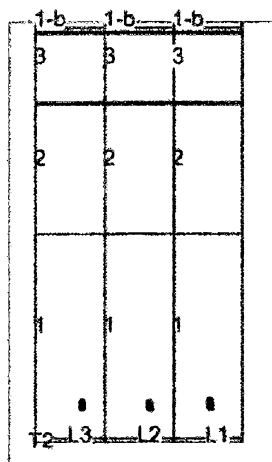
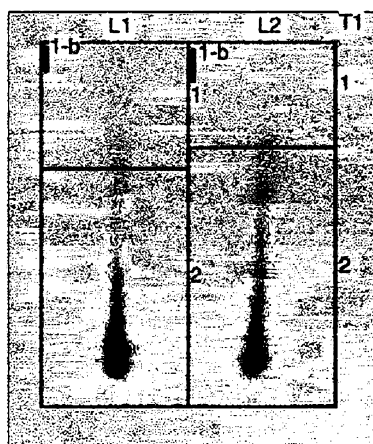


Fig. 2



Fig. 3



Stan techniki

Fig. 4

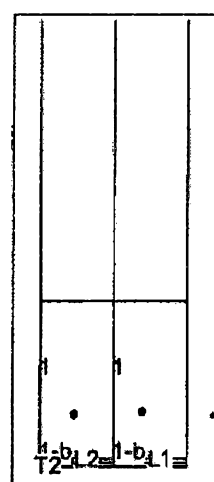


Fig. 5

