

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 85 166

REQUERENTE: HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT, alemã, com
sede em D-6230 Frankfurt am Main 80,
Alemanha

EPÍGRAFE: "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE UM MEIO
DE DIAGNÓSTICO PARA A REPRESENTAÇÃO CIN-
TILOGRÁFICA DE TUMORES MALIGNOS"

INVENTORES: Erich Obernhausen, Ludwig Kuhlmann,
Gerhard Seibert, Axel Steinstrasser,
Hans -Joachim Schroth e Karl-Heinz
Bremer

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4º da Convenção de Paris
de 20 de Março de 1883.

Alemanha, em 27 de Junho de 1986, sob o No. DE 3621570

Memória descritiva referente à patente de invenção de HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT, alemã, (inventores: Prof. Dr. Dr. Erich Oberhausen, Dr. Ludwig Kuhlmann, Prof. Dr. Gerhard Seibert, Dr. Dr. Axel Steinstrasser, Dr. Hans-Joachim Schroth e Dr. Karl-Heinz Bremer, residentes na República Federal Alemã), industrial e comercial, com sede em D-6230 Frankfurt/Main 80, República Federal Alemã, para "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE UM MEIO DE DIAGNÓSTICO PARA A REPRESENTAÇÃO CINTILOGRÁFICA DE TUMORES MALIGNOS"

Memória descritiva

A presente invenção refere-se a um meio de diagnóstico para a representação cintilográfica de tumores malignos, a um processo para a representação cintilográfica de tumores malignos com este meio de diagnóstico, e a um processo para a preparação do meio de diagnóstico.

Existe desde há muito tempo o desejo de se ter à disposição um meio de diagnóstico que permita reconhecer desde os primeiros instantes o tamanho e a localização de tumores malignos. Realizaram-se imensos ensaios com este objectivo, recorrendo a métodos da medicina nuclear, para se conseguir tornar sensível e puder representar gráficamente o perfil de distribuição de substâncias do corpo humano acopladas a nuclídeos que emitem radiação gama. O êxito deste método depende do facto de se conseguir dispôr de substâncias que se liguem aos tumores malignos de forma específica ou não específica.

Para a cintilografia de tumores já se dispõe de um número considerável de substâncias associadas a tumores que, todavia, não são específicas do tumor e cuja afinidade ao tumor é frequentemente desconhecida. Entre estas encontram-se substratos inorgânicos como citrato de gálio-67, cloreto de índio-111 e cloreto de bismuto-206. Mas também já foram utilizados na localização cintilográfica de tumores metabolitos provenientes do metabolismo do tumor com glutamato de azoto-13 e metionina de selênio-75 (ver E. Henze, "Szintigraphische Lokalisationsdiagnostik von Tumoren", Münch.med. Wschr. 127,182-184 (1985)). Finalmente foram também já utilizados meios citostáticos marcados radioativamente, como bleomicina de cobalto-57, ou proteínas associadas a tumores, como antifibrina de iodo-131. A todas estas substâncias é comum o facto de frequentemente só alcançarem o tumor em concentrações muito fracas, de modo que não é possível uma determinação nítida da localização do tumor, especialmente tal não se torna possível quando se trata de aglomerados de pequenos tumores.

Contudo, a cintilografia de tumores deu também, nestes últimos anos, um passo em frente essencial através da disponibilidade de anticorpos monoclonais ou dos seus fragmentos imunoactivos marcados radioativamente e específicos dos tumores (ver A.M. Keenan, J.C. Harbert e S.M. Larson, "Monoclonal Antibodies in Nuclear Medicine", The Journal of Nuclear Medicine, vol. 26, 531-537 (1985)). Uma cinética in vivo melhorada destes anticorpos já produziu resultados muito encorajadores. A técnica da medicina nuclear de que se dispõe actualmente permite uma representação quantitativa e tomográfica. Ainda não há, contudo, uma grande experiência clínica no que se refere à sensibilidade, especificidade ou acções colaterais devido à heterogeneidade dos anticorpos usados até ao presente. Resulta daqui que os anticorpos monoclonais só podem alcançar os tumores que transportam sobre a superfície das células o antigene exactamente correspondente. A alta especificidade dos anticorpos monoclonais não permite, por conseguinte, uma comprovação generalizada de quaisquer tumores.

Tornou-se recentemente conhecido através do Pedido de Patente Europeia 142 641 um meio para a diagnose e terapia de tumores, o qual contém um imunomodulador marcado com um agente emissor de radiações radioactivas, um corante ou um meio citostático. Este meio é administrado de preferência conjuntamente com um "cocktail" constituído por um aldeído e um álcool. Entre os imunomoduladores preferidos contam-se derivados de dipeptídeos de ácido muramílico, peptidoglicanos ou extractos isentos de peptidoglicanos de diversas espécies de bactérias. Em pacientes que tinham tomado o "cocktail" referido 30 minutos antes da administração do meio de diagnóstico foi possível fazer-se a localização do tumor.

Descobriu-se agora que se pode prescindir da administração de um "cocktail" constituído por um aldeído e um álcool se, na representação cintilográfica de tumores malignos, for utilizado um meio de diagnóstico que contém uma substância obtida pelo tratamento enzimático de mureína à qual está ligado um radionuclido por meio de um aglutinante complexo.

Quanto à distância obtida pelo tratamento enzimático da mureína, trata-se de uma mistura de componentes como é descrita por exemplo por B. Glauner e U. Schwarz, em "The Analyses of Murein With HPLC", em The Target of Penicillin, págs. 29-34, Berlim 1983,

Entre estes conta-se um componente de mu-ropeptídeos cíclicos, por exemplo mu-ropeptídeos em C_4 como são descritos por W. Weidel e H. Pelzer, Adv. in Enzymol 26, 193-232 (1964), e um componente de fragmentos de mureína de peso molecular elevado com um peso molecular de cerca de 10 000. Esta substância é obtida pondo em suspensão mureína de células de *Escherichia coli* (10 mg/ml), preparada por um processo conhecido da literatura, em acetato de amónio 0,05M e incubando com 10 µg/ml de albumina de ovo de galinha-lisozima durante 18 horas a 37°C. Depois da sedimentação dos constituintes insolúveis a 50 000 x g extrai-se com clorofórmio e a fase aquosa é seca.

O acetato de amônio é eliminado a 50°C em vácuo ao longo de 65 horas.

Aos grupos amino livres desta substância liga-se um complexante, tal como ácido etilenodiaminotetracético, ácido dietilenotriaminopentacético ou ácido nitrilotriacético, o qual transporta um radionúclido. Utilizam-se de preferência para este efeito tecnécio-99 ou índio-111.

É particularmente vantajoso que o meio de diagnóstico de acordo com a invenção possa ser preparado pelo tratamento de paredes celulares de quaisquer bactérias. É por conseguinte obtido de preferência a partir de *Escherichia coli*, visto que este microorganismo pode ser obtido comercialmente na forma de uma massa celular congelada. A substância obtida pelo tratamento enzimático da mureína é convenientemente levada a reagir à temperatura ambiente com o complexante. Depois da separação do excesso de complexante a solução é liofilizada e misturada com a actividade desejada do radionúclido. Seguidamente realiza-se uma filtração estéril e o ajustamento à concentração de actividade pretendida com solução de soro fisiológico isotónica.

O meio de diagnóstico assim obtido é, surpreendentemente, apropriado para tornar visíveis tumores malignos das mais diversas naturezas. Podem ser facilmente reconhecidos tanto tumores das partes moles como também tumores dos ossos.

A preparação e a utilização do meio de diagnóstico são elucidadas com base nos seguintes exemplos:

Exemplo 1

Acoplamento do ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA)

10 mg de mureína obtida de *E. coli* e tratada enzimaticamente por

um processo genericamente conhecido são dissolvidos em 0,5 ml de tampão de bicarbonato 0,05 M pH 8,2, misturados à temperatura ambiente com 10 mg de anidrido de DTPA bicíclico e deixados em repouso 10 minutos à temperatura ambiente. O excesso de DTPA é separado cromatograficamente (material de suporte: sílica-gel RP-18; eluente: solução 0,1 M de fosfato pH 4,69 e metanol; água 70:30). A solução do preparado assim obtida é dividida em pequenas porções e liofilizada.

Exemplo 2

Reacção com índio-111

O liofilizado é dissolvido em tampão de citrato de amónio 0,1 M pH=6,5 e misturado à temperatura ambiente com a actividade desejada, por exemplo 100 MBq, de citrato de índio-111. O citrato de índio-111 é preparado a partir do cloreto de índio-111 que pode ser adquirido comercialmente, por diluição a 1:1 com citrato de amónio 0,1 M pH=6,5. Depois de 10 min. de repouso à temperatura ambiente a solução é filtrada estéril através de um filtro e é ajustada à concentração de actividade pretendida com solução isotónica de soro fisiológico.

A pureza radioquímica pode ser comprovada por cromatografia líquida de alta pressão.

Material de suporte: sílica-gel RP-18

Eluente: 20 min 0,1 m H_3PO_4 pH= 4,69+15% CH_3OH
120 min 0 100% 0,1m H_3PO_4 pH=4,69+15% CH_3OH

O preparado depois de filtrado pelo filtro estéril está apto a ser injectado. O processo de marcação pode ser realizado tanto pelo preparador como também pelo utilizador.

Exemplo 3

Ensaio com animais

No músculo da pata dianteira direita de uma ratazana (Sprague-Dawley) foi implantado um carcinoma de Walker 256 (tumor das partes moles). Depois de se verificar que o tumor se desenvolvia normalmente administrou-se ao animal, por injeção intravenosa, 0,5 ml do preparado (0,3 MBq de índio-111). O cintilograma obtido ao fim de 2 h está representado na fig. 1. O tumor é demarcável nitidamente na pata direita. O cociente tumor/músculo é de 4.

Exemplo 4

Ensaio com animais

A uma ratazana (Sprague-Dawley) à qual tinha sido implantada na pata traseira direita um osteossarcoma (tumor osseo) aplicaram-se i.v. 0,5 ml (0,3 MBq de índio-111) do preparado. No cintilograma obtido passadas 2 h (fig. 2) localiza-se nitidamente o tumor. A relação medida tumor/músculo era igualmente de 4.

R E I V I N D I C A Ç Õ E S

- 1ª -

Processo para a preparação de um meio de diagnóstico para a representação cintilográfica de tumores malignos, caracterizado pelo facto de se ligar um rádionuclido, com auxílio de um complexante, a uma substância obtida pelo tratamento enzimático de mureína.

- 2ª -

Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de se liofilizar a substância obtida por tratamento da mureína depois da ligação ao complexante e de se pôr de novo em solução só para a marcação.

- 3ª -

Processo de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo facto de se utilizar como radionuclídeo tecnécio-99 ou índio-111.

- 4ª -

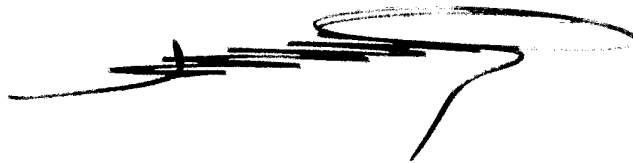
Processo de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo facto de o produto de decomposição da mureína ser obtido a partir da mureína de *Escherichia coli*.

- 5ª -

Processo de acordo com as reivindicações 1 ou 2, caracterizado pelo facto de se utilizar como complexante ácido dietilenotriaminopentacético.

A requerente declara que o primeiro pedido desta patente foi apresentado na República Federal Alemã em 27 de Junho de 1986, sob o nº. P 36 21 570.8.

Lisboa, 25 de Junho de 1987



- 7 -

RESUMO

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE UM MEIO DE DIAGNÓSTICO PARA A REPRESENTAÇÃO CINTILOGRÁFICA DE TUMORES MALIGNOS"

A invenção refere-se a um processo para a preparação de um meio de diagnóstico para a representação cintilográfica de tumores malignos, que compreende ligar-se um radionuclido, com auxílio de um complexante, a uma substância obtida pelo tratamento enzimático de mureína.

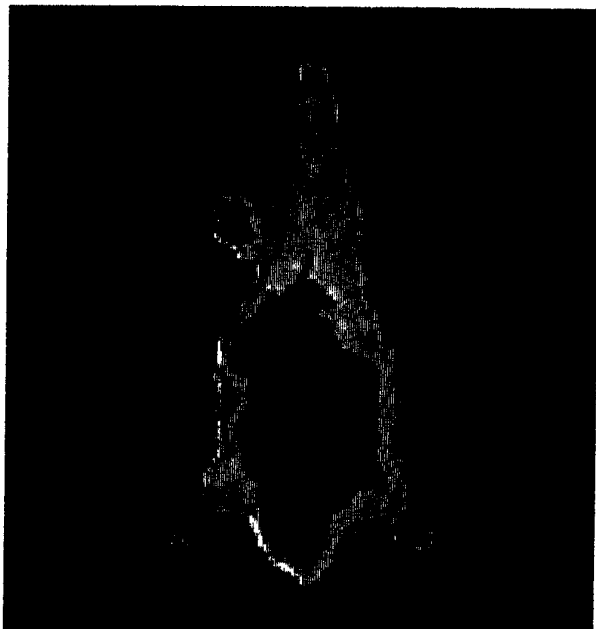


FIG.1

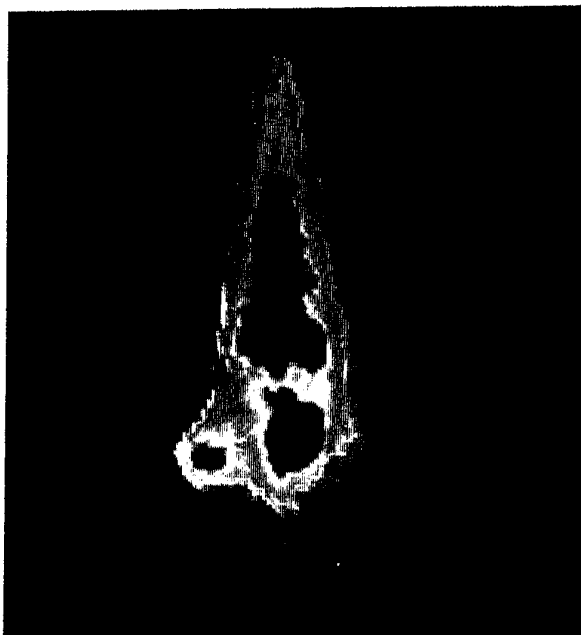


FIG.2