

PŘÍHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2002 - 782

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **23.08.2000**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **01.09.1999**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1999/9910970**

(33) Země priority: **FR**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **14.08.2002**
(Věstník č. 8/2002)

(86) PCT číslo: **PCT/IB00/01161**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO01/15746**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷ :

A 61 K 51/08

A 61 K 51/12

(71) Přihlašovatel:

SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT, Berlin, DE;

(72) Původce:

Bellande Emmanuel, Saulx Les Chartreux, FR;

Jallet Pierre, Au Lion D'Angers, FR;

Denizot Benoît, Angers, FR;

(74) Zástupce:

Všetečka Miloš JUDr., Hálkova 2, Praha 2, 12000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Radiofarmaceutické produkty a způsob jejich
přípravy**

(57) Anotace:

Řešení se týká radiofarmaceutických produktů a způsobů jejich přípravy. tyto produkty mohou být použity pro účely techniky pulmonální scintigrafie nebo pro terapeutické účely. tyto produkty zahrnují polysacharid a sekvestrační skupiny reprezentované vzorci R-NH₂, R-N₃, a R-NR'-N₃, kde R představuje uhlovodíkovou nebo aromatickou skupinu zahrnující přinejmenším jeden atom síry a R' představuje vodíkový atom nebo alkylovou skupinu, jako například metylovou skupinu, kde tyto sekvestrační skupiny vytvářejí komplex chelátového typu s radioaktivním kovem, jako například techneciem.

17.05.02

2002 - 782

Radiofarmaceutické produkty a způsob jejich přípravy

Oblast techniky

Vynález se týká radiofarmaceutických produktů, které mohou být použity pro diagnostické nebo terapeutické účely, a dále se týká způsobu přípravy těchto produktů.

Vynález se zejména týká radiofarmaceutických produktů vytvořených například ze suspenze částic značkových radioaktivním izotopem, kde tyto produkty jsou použitelné zejména v oblasti pulmonální scintigrafie, aby tak například mohla být provedena diagnóza v případě, kdy se očekává plicní embolie.

V tomto případě jsou tyto produkty používány ve formě částic, které ve výhodném provedení vykazují kulovitý tvar a jejichž velikost se pohybuje v rozmezí od 10 μm do 100 μm . Jelikož ovšem plicní kapiláry vykazují průměr přibližně 7 μm , zůstávají tyto částice po jejich intravenózní aplikaci blokovány v těchto kapilárách, což umožňuje zviditelnit anomálie v zásobování plic krví.

Tyto produkty musí samozřejmě vyhovět určitému počtu farmaceutických omezení. Zejména musí tyto produkty vykazovat vhodnou in-vivo degradační rychlost, která je dostatečně pomalá, aby umožnila vytvoření obrazového záznamu, například s pomocí zařízení pro snímání gama záření, kde tato rychlost dosahuje minimální hodnoty přibližně jedné hodiny, přičemž tato rychlost je ale současně dostatečně vysoká, aby tak nebylo vyvoláváno trvalé ucpávání plicních kapilár, což by mohlo vést k malým

trombózám. Tyto produkty nesmí navíc být pro organismus toxické, musí být sterilizovatelné, například s pomocí autoklávu nebo zářením, musí být schopny snadného označení radioaktivním kovem a musí být schopny zabalení do podoby stabilní značkovací soupravy.

Dosavadní stav techniky

Například francouzská patentová přihláška FR-A-2 273 516 předložená v roce 1975 společností PHARMACIA AKTIEBOLAG sídlící ve Švédsku popisuje použití kulovitých mikročástic amyl-pektinu síťovaného epichlorhydrinem a značkováného jednoduchým smícháním s izotopem ^{99m}Tc pro použití v oblasti pulmonální perfúzní scintigrafie. Použití těchto částic ovšem přináší několik nevýhod. Ve skutečnosti jsou to pouze hydroxylové skupiny použitého amyl-pektinu, které umožňují značkování této směsi, a tyto skupiny bohužel vytvářejí pouze slabé vazby s techneciem a neumožňují tedy stabilní značkování. Popsaný způsob přípravy navíc používá mnoho rozpouštědel a emulgátorů, které se obtížně oddělují od připravených částic. U tohoto typu částic nemůže být navíc ani přesně měřena ani regulována rychlost síťování.

Tento dokument navíc nepopisuje kit (soupravu) vyhovující potřebám běžného použití v oblasti nukleární medicíny. Při zacházení s injektovatelným přípravkem použitelným pro lidské pacienty je v praxi nezbytné provést několik manipulačních kroků, jako například připojení pocínovaného uzávěru ke sterilní lahvi, odstředění, znovuvytvoření suspenze, atd., kde tyto kroky nejsou kompatibilní s požadavkem na sterilitu.

Získané roztoky potom konečně nejsou stabilní a

epichlorhydrin použitý pro zesítení je považován za velmi toxickou a mutagenní látku.

Autoři vynálezu demonstrovali další nedostatky těchto kulovitých mikročástic ve srovnávacích příkladech 1 a 2 uvedených v dalším.

Francouzská patentová přihláška FR-A-2 285 857 předložená v roce 1975 společností PHARMACIA FINE CHEMICALS AB sídlící ve Švédsku popisuje využití polysacharidových částic připojených k různým sekvestračním činidlům a značkových s pomocí radioaktivních izotopů. Tyto částice zahrnují chelatující skupiny spojené kovalentními vazbami, ke kterým je radioaktivní jádro připojeno ve formě komplexů chelátového typu, které se v principu skládají přinejmenším ze čtyř, ve výhodném provedení přinejmenším pěti až osmi, cyklických jader s pěti až šesti skupinami obklopujících příslušný kov a dále ze dvou koordinačních atomů kovů. Tímto polysacharidem je polysacharid zesítený chemicky, například s pomocí epichlorhydrinu nebo epibromhydrinu. Ponecháme-li stranou značkování, potom tyto částice přinášejí stejné problémy jako částice zmíněné výše v případě dokumentu FR-A-2 273 516. Tento dokument navíc neuvádí žádné příklady značkování techneciem. Značkovací procedura zde dále zahrnuje zahřívání na teplotu 100 °C v přítomnosti radioaktivního prvku, promývání a sušení následně po značkování, což vůbec není kompatibilní s myšlenkou výše zmíněné značkovací soupravy a s omezeními z hlediska sterility při použití.

I přesto, že popsaná metoda značkování umožňuje, aby částice byly značkovány relativně stabilním způsobem, tato metoda neumožňuje přípravu značkovací soupravy (kitu), která

by byla farmaceuticky přijatelná, a to zejména z toho důvodu, že obsahuje epichlorhydrin, a která by byla snadno použitelná v oblasti nukleární medicíny.

Kulovité mikročástice popsané v těchto dvou patentových přihláškách nejsou tedy adaptovány tak, aby vyhovovaly příslušným farmaceutickým omezením a nemohou proto být pro daný účel použity. Tyto kulovité mikročástice navíc nebyly nikdy použity pro účely pulmonální scintigrafie. Od tohoto typu produktu bylo tedy posléze upuštěno.

Mnoho výzkumných projektů realizovaných od roku 1975 s cílem vytvořit nové zdokonalené radiofarmaceutické produkty bylo zaměřeno na produkty na bázi albuminového séra a jeho derivátů. Tyto krevní produkty vyhovují příslušným farmaceutickým omezením a mohou být použity zejména pro účely pulmonální scintigrafie. Tyto produkty jsou v současné době využívány v oblasti nukleární medicíny.

M. A. Davis například v roce 1975 v dokumentu "*Radiopharmaceuticals N. Y.*" (1975, strany 267 až 281) popisuje radioaktivní částice určené pro studium pulmonální perfúze. Částice popsané v tomto dokumentu jsou představovány makro-agregáty albuminu ze séra značkováného radioaktivním jódem (^{131}I -MAA) nebo kulovitými mikročásticemi albuminu z denaturovaného lidského séra značkováného s pomocí technecia ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HAM). Kulovité mikročástice $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HAM jsou výhodné vzhledem k jednotné velikosti částic pohybující se v zásadě v rozmezí od 40 μm do 50 μm . Tento dokument navíc popisuje obecné charakteristiky vyžadované pro tento typ radiofarmaceutických částic.

Dokument R. Guirauda "*Macro-aggregates and radioactive microspheres*" (*Radiopharmaceuticals*, 1997, 519) popisuje makro-agregáty albuminu (MAA) a kulovité mikročástice albuminu lidského séra. Tento dokument popisuje značkování těchto mikro-agregátů a mikročástic techneciem ^{99m}Tc s pomocí roztoku chloridu cínatého. Dokument rovněž uvádí, že optimální velikost těchto mikročástic činí $15 \pm 5 \mu\text{m}$. Dokument zmiňuje organické mikročástice škrobu.

V současné době jsou tyto makro-agregáty a mikročástice albuminu lidského séra značkové techneciem ^{99m}Tc zdaleka nejvíce používány v oblasti nukleární medicíny. Tyto produkty ovšem vykazují několik nevýhodných charakteristik. Proměnlivost a kvalita šarží lidského albuminu například někdy činí přípravu diagnostických souprav obtížnou, neboť tyto šarže obsahují částice, které mohou vykazovat proměnlivou velikost a počet. Jednou z hlavních nevýhod je ale lidský původ těchto částic, což může přinášet vážné problémy potenciální životu nebezpečné kontaminace typu HIV, žloutenky nebo Creutzfeld-Jakobovy choroby.

Bylo by proto velmi zajímavé mít možnost připravit kulovité mikročástice značkové techneciem ^{99m}Tc , které nejsou lidského původu, aby tak byla zajištěna dokonalá bezpečnost.

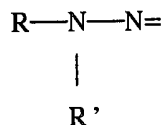
Se zřetelem na tuto skutečnost popisuje v poslední době publikovaný dokument A. C. Perkinse (*Nuclear Medicine Communications*, 1999, 20, 1-3) způsoby nahrazení radiofarmaceutických produktů získávaných z krve. Tento dokument zejména zmiňuje využití rekombinovaných materiálů,

syntetických polymerů a polypeptidů. V tomto dokumentu nejsou ovšem zmíněny polysacharidy.

Podstata vynálezu

Cílem tohoto vynálezu je tedy překonání nevýhodných charakteristik zmíněných výše v souvislosti s produkty podle dosavadního stavu techniky, kde tohoto cíle je dosaženo vytvořením radiofarmaceutického produktu vykazujícího schopnost snadného značkování, například techneciem ^{99m}Tc , a dále vykazujícího velmi dobrý pulmonální záchyt, což bylo autory vynálezu demonstrováno na krysách, přičemž tento produkt je netoxický, snadno biodegradovatelný, snadno sterilizovatelný, může být balen do podoby soupravy připravené pro značkování, je stabilní a vyhovuje farmaceutickým omezením platným pro tento typ produktu. Tyto a další výhody budou zřejmé z dále uvedeného popisu.

Radiofarmaceutický produkt podle tohoto vynálezu je charakteristický tím, že obsahuje polysacharid opatřený sekvestračním činidlem připojeným k polysacharidu kovalentní vazbou a vybraným ze skupiny funkčních skupin reprezentovaných vzorci R-NH- , R-N= , a



ve kterých R představuje uhlovodíkovou nebo aromatickou skupinu obsahující přinejmenším jeden atom síry a R' představuje vodíkový atom nebo alkylovou skupinu, jako například methylovou skupinu, kde tyto sekvestrační skupiny vytvářejí komplex chelátového typu s radioaktivním kovem

vybraným ze skupiny zahrnující technecium, rhenium, měď, yttrium, erbium, galium a samarium.

Alkylové skupiny využitelné pro skupinu R' mohou být lineární nebo rozvětvené a ve výhodném provedení obsahují od jednoho do pěti uhlíkových atomů.

V provedení podle vynálezu mohou být polysacharidy rozpustné nebo mohou být ve formě mikročástic. V provedení podle vynálezu mohou potom být tyto polysacharidy vybrány ze skupiny látek zahrnující například přírodní škrob, celulózu nebo zesítený amyl-pektin.

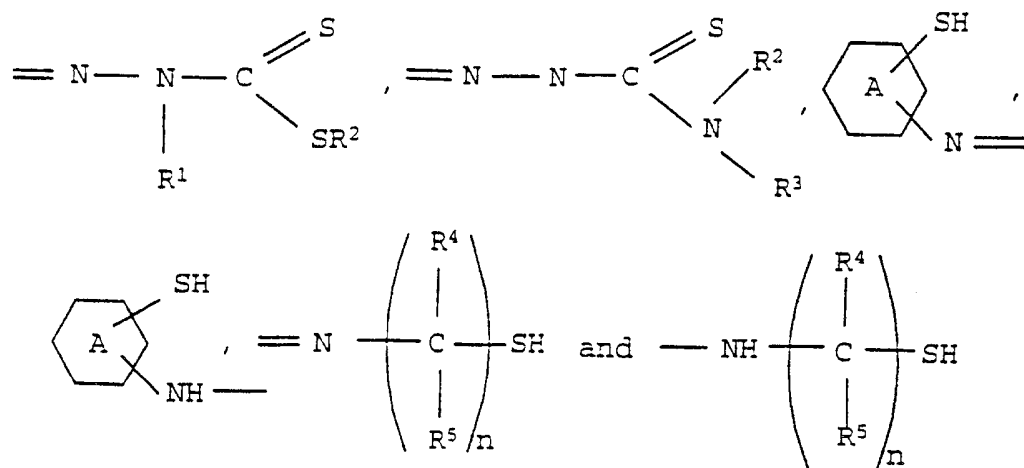
Tímto přírodním škrobem může například být kukuřičný škrob.

Tyto polysacharidy mohou být ve formě mikročástic, například ve formě kulovitých mikročástic.

Autoři tohoto vynálezu rovněž prokázali, že modifikovaná celulóza podle vynálezu poskytuje velmi dobrý pulmonální záchyt a nižší rychlost eliminace nežli v případě škrobu. Modifikovaná celulóza podle tohoto vynálezu může proto být rovněž použita pro radioterapii, například při značkování provedeném s pomocí rhenia, mědi nebo jednoho z výše zmíněných kovů, neboť tato celulóza odpovídá radioterapeutické potřebě použít mikročástic s delším poločasem rozpadu.

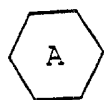
V provedení podle vynálezu mohou být sekvestrační skupiny vybrány například ze skupin reprezentovaných vzorci:

17.05.02



ve kterých:

R^1 , R^2 , R^3 , R^4 a R^5 představují nezávisle vodíkové atomy, nasycené nebo nenasycené uhlovodíkové skupiny, karboxylové skupiny nebo aromatické skupiny,

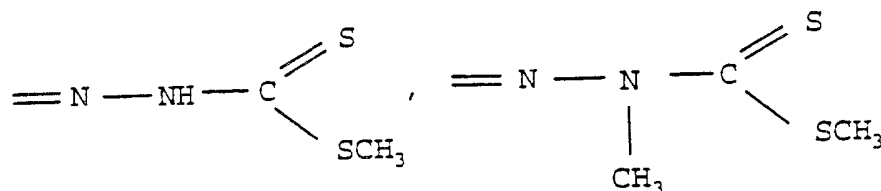


představuje aromatické jádro, které

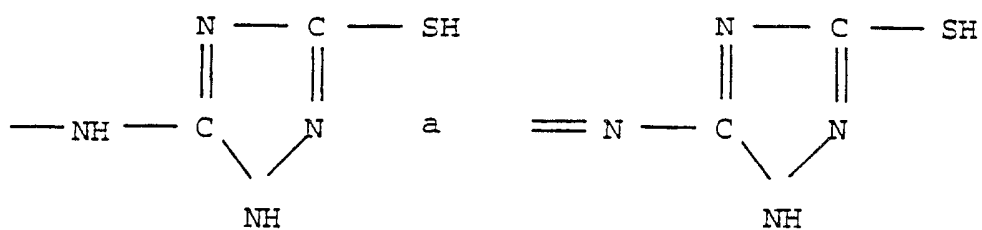
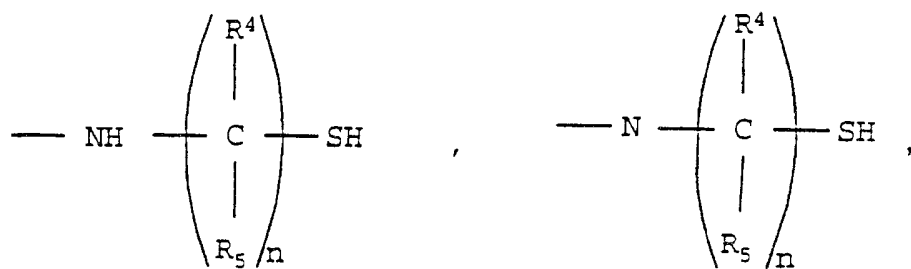
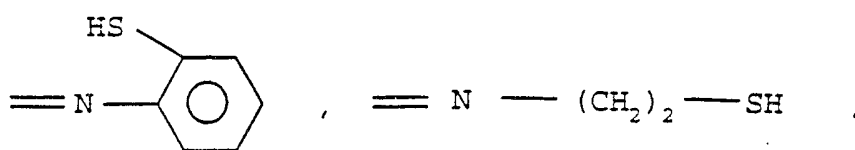
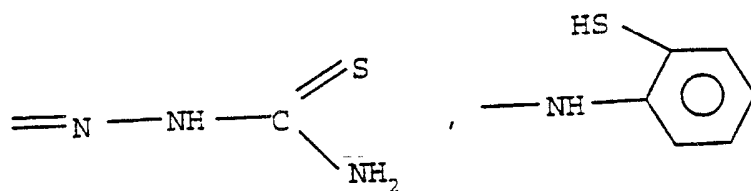
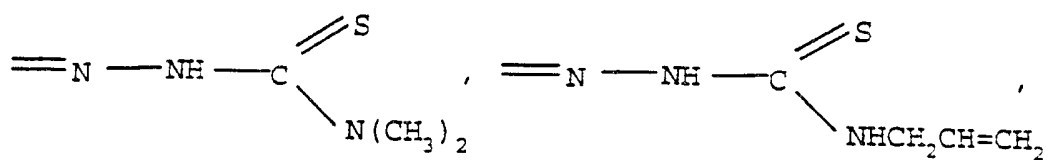
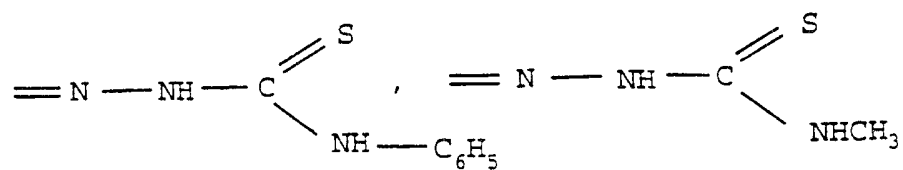
případně může obsahovat jeden nebo několik heteroatomů,

a n představuje celé číslo pohybující se v rozmezí od jedné do pěti.

Tyto sekvestrační skupiny mohou tedy například být vybrány ze skupin representovaných vzorci:



17.05.02



V provedení podle vynálezu mohou mikročástice, například ve tvaru kulovitých mikročástic, vykazovat velikost pohybující se v rozmezí od 0,01 μm do 100 μm , ve výhodném provedení v rozmezí od 10 μm do 50 μm , pro použití při diagnóz prováděné technikou pulmonální scintigrafie, zatímco pro terapeutické účely se tato velikost pohybuje v rozmezí od 0,1 μm do 5 μm .

V provedení podle vynálezu se může zastoupení sekvestračních skupin pohybovat v rozmezí od 0,1% do 50%, při vztažení na sacharidové struktury polysacharidu, přičemž ve výhodném provedení se toto zastoupení pohybuje v rozmezí od 2% do 15%.

V provedení podle vynálezu může v radiofarmaceutickém produktu, zejména pokud je tento produkt určen pro diagnostické účely, být jako radioaktivní kov použito technecium $^{99\text{m}}\text{Tc}$ nebo galium-67.

Tento způsob použití může například připadat v úvahu tehdy, je-li radiofarmaceutický produkt použit pro techniku pulmonální scintigrafie.

V provedení podle vynálezu může v radiofarmaceutickém produktu, zejména pokud je tento produkt určen pro terapeutické účely, být jako radioaktivní kov použito rhenium-186 nebo rhenium 188, měď-64 nebo měď-67, yttrium-90, erbium-169 nebo samarium-153.

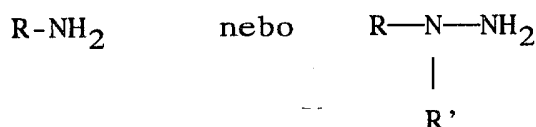
V provedení podle vynálezu může tento radiofarmaceutický produkt existovat ve formě suspenze kulovitých mikročástic ve fyziologicky přijatelném kapalném médiu nebo může existovat v lyofilizované formě.

17.05.02

Tento vynález se rovněž týká způsobu přípravy radiofarmaceutického produktu podle vynálezu, kde tento způsob zahrnuje následující kroky:

(a) přivedení polysacharidu, jako například polysacharidu zmíněného výše, k oxidaci provedené s pomocí jodistanu,

(b) přivedení zoxidovaného polysacharidu k reakci se sloučeninou obsahující primární aminovou funkční skupinu nebo hydrazin reprezentovaný vzorcem



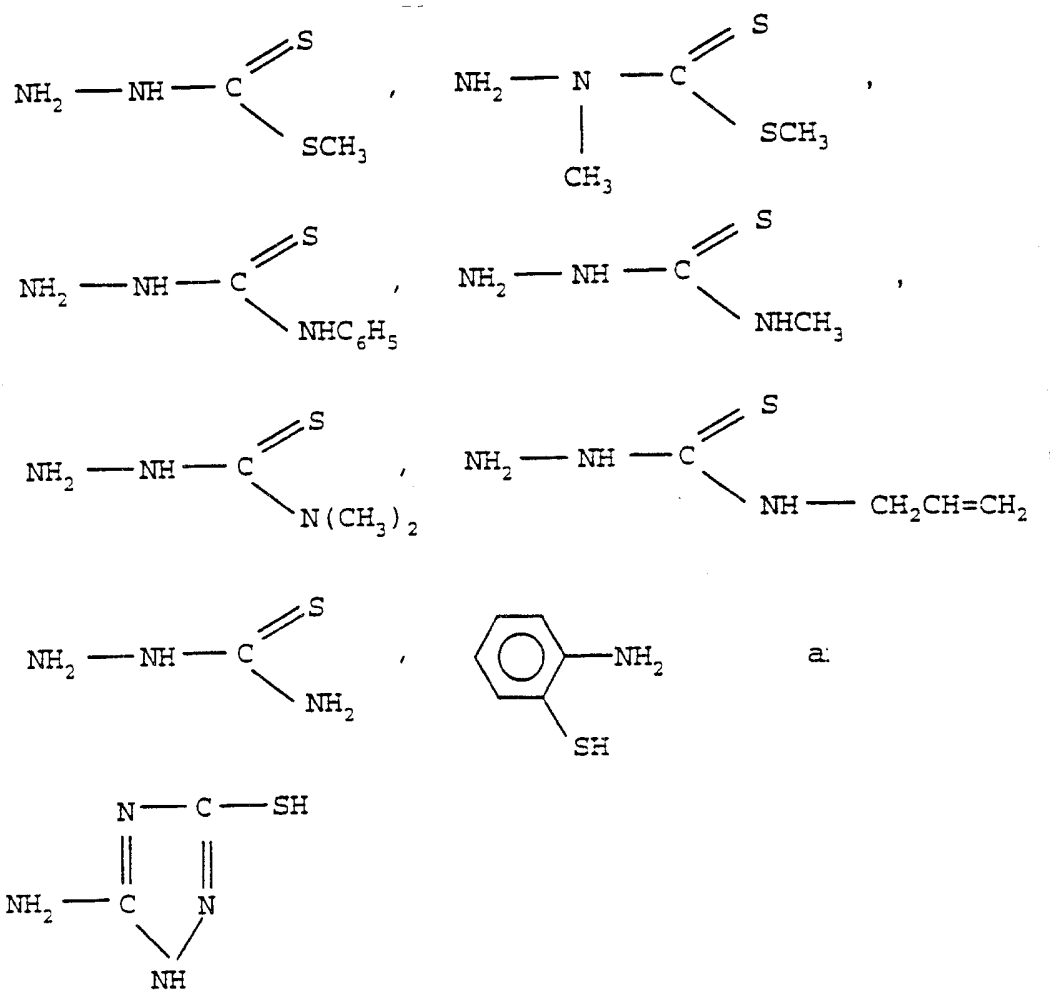
(c) kde R představuje uhlovodíkovou nebo aromatickou skupinu zahrnující přinejmenším jeden atom síry, aby tak k tomuto polysacharidu mohly být kovalentním způsobem navázány skupiny vykazující sekvestrační schopnost vůči kovům a představované vzorci R-NH-, R-N= nebo R-NH-N=, zatímco R' představuje vodíkový atom nebo alkylovou skupinu, jako například methylovou skupinu,

(d) přivedení polysacharidu nesoucího sekvestrační skupiny k reakci se solí radioaktivního kovu vybraného ze skupiny kovů zahrnující technecium, rhenium, měď, yttrium, erbium a samarium.

Oxidace provedená s pomocí jodistanu může být představována procesem popsáním například v publikaci C. L. Mehlrettera "*Methods in Carbohydrate Chemistry*" (Vol. IV, 1964) a používaným zejména pro oxidaci škrobu, dextranu nebo celulózy. Tento proces je použit v příkladech uvedených v dalším.

V provedení podle vynálezu může sloučenina obsahující primární aminovou funkční skupinu odpovídat vzorci $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_n-\text{SH}$, kde n představuje celé číslo pohybující se v rozmezí od jedné do pěti, přičemž v rámci daného procesu může být mezi krokem (b) a krokem (c) zahrnut dodatečný krok redukce této sloučeniny provedený s pomocí tetrahydridoboritanu sodného.

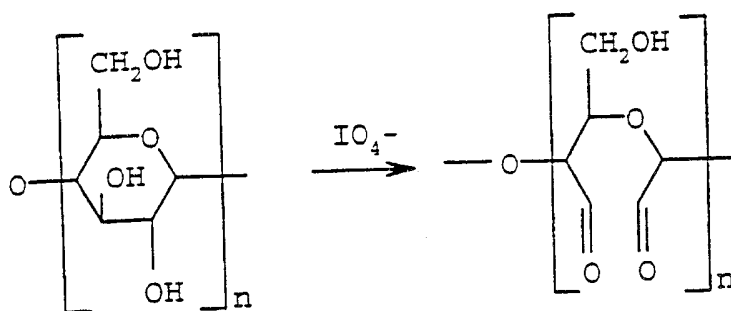
V provedení podle vynálezu může sloučenina navázána na polysacharid odpovídat například jednomu z následujících vzorců:



V provedení podle vynálezu může být obsah sekvestračních skupin fixovaných na polysacharidu regulován řízením úrovně oxidace polysacharidu ve výše zmíněném kroku (a). Tato úroveň oxidace polysacharidu se například může pohybovat v rozmezí od 10% do 50%. Obsah sekvestračních skupin se potom může například pohybovat v rozmezí od 2% do 15%.

Pro realizaci procesu značkování polysacharidu podle vynálezu, například techneciem ^{99m}Tc , proto tedy autoři používají dvoustupňový transformační postup.

První krok uskutečněný v rámci tohoto postupu spočívá v řízené oxidaci polysacharidu provedené s pomocí jodistanu. Na každé jednotce zoxidované glukózy tedy dojde k vytvoření dvou aldehydových skupin v sousedních pozicích, kde tato chemická reakce probíhá podle níže uvedeného reakčního schématu:



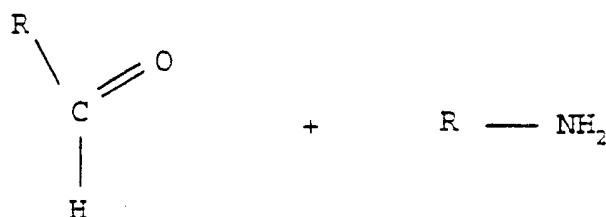
přírodní glukosidový
monomer

zoxidovaný glukosidový
monomer

Úroveň oxidace polysacharidu může být proměnná a může být snadno nastavena. Výtěžek této oxidační reakce je ve skutečnosti blízký 100% a úroveň oxidace může být tedy vypočítána na základě množství přidaného jodistanu. Obecně jsou používány úrovně oxidace nižší než 50%, aby tak struktura makromolekuly byla modifikována pouze mírně. Skutečná úroveň oxidace, která se tedy může pohybovat v rozmezí od 1% do 100%, může být snadno určena s pomocí kolorimetrické metody.

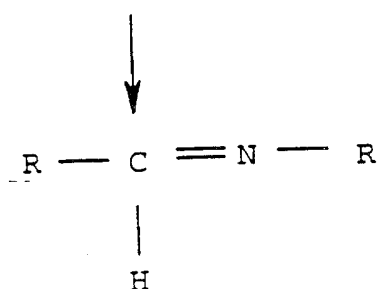
Ve druhém kroku je potom zoxidovaný polysacharid přiveden k reakci s molekulou obsahující aminovou nebo hydrazinovou skupinu a odpovídající obecnému vzorci RNH_2 nebo RNHNH_2 , aby tak byla vytvořena chelatační skupina schopná sekvestrovat technecium. Tímto způsobem je tedy získán ligand typu Schiffovy báze nebo thiosemikarbazon.

Tento druhý krok může být sumarizován následujícím způsobem:



aldehydová skupina

amin nebo hydrazin



funkcionalizovaná aldehydová skupina

kde:

1. $\text{R} = \text{NR}_1(\text{C}=\text{S})\text{SR}_2$ (Schiffovy báze pocházející z dithiokarbazátu)
2. $\text{R} = \text{NR}_1(\text{C}=\text{S})\text{NR}_2\text{R}_3$ (thiosemikarbazony)
3. R = aromatické skupiny (aromatické Schiffovy báze)
4. R = alkylové skupiny (alkylové Schiffovy báze), v tomto případě nejsou Schiffovy báze stabilní a je tedy s pomocí tetrahydridoboritanu proveden druhý stupeň redukce $\text{C}=\text{N}$ vazby, aby tak byla dosažena její stabilizace, a poté je získána aminová vazba $\text{C}-\text{NHR}$.

V provedení podle vynálezu může krok (c) například spočívat v přivedení kulovitých mikročástic polysacharidu

zahrnujícího sekvestrační skupiny do kontaktu například s roztokem technecianu $^{99m}\text{TcO}_4^-$ v přítomnosti redukčního činidla, jako například chloridu cínatého.

V provedení podle vynálezu mohou tedy být mikročástice, například kulovité mikročástice, například kukuřičného škrobu nebo škrobu na bázi zesíťného amylo-pektinu oxidovány a poté spojeny do molekuly obsahující aminovou nebo hydrazinovou funkční skupinu, například S-methyldithiokarbazát. Částice modifikované tímto způsobem mohou být snadno značkovány například s pomocí technecia ^{99m}Tc .

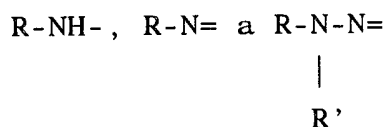
Tento vynález tedy zejména poskytuje mikročástice připravené například na bázi škrobových částic, kde tyto mikročástice nevykazují nevýhodné charakteristiky zmíněné výše v souvislosti s albuminem. Škrob je navíc v lékopisech popisován jako vehikulum. Je tedy snadno dostupný při nízkých nákladech.

Mikročástice podle tohoto vynálezu rovněž přinášejí výhodu spočívající ve skutečnosti, že tyto částice mohou být snadno sterilizovány, například procesem ozáření, a rovněž mohou být snadno zpracovány do formy soupravy připravené pro značkování.

Autoři vynálezu navíc demonstrovali, že v provedení podle vynálezu může být rychlost pulmonálního pročištění modifikována v závislosti na úrovni oxidace mikročástic použitých v rámci tohoto vynálezu, což například není možné v případě kulovitých mikročástic připravených s pomocí lidského albuminu.

Další výhoda provedení podle vynálezu spočívá v jednoduchosti provedení dané procedury, kde reakční podmínky jsou velmi šetrné - reakce probíhají za teploty okolí, ve vodném médiu, při dosažení kvazikvantitativních výtěžků. Sekvestrační reakce, například s techneciem, jsou navíc kvantitativní, přičemž tyto reakce probíhají při pokojové teplotě a bez koncového čištění, což umožňuje adaptaci na požadavky sterility a jednoduchosti přípravy nezbytné pro použití souprav na bázi technecia v nemocničním prostředí.

Tento vynález rovněž poskytuje diagnostický kit (soupravu), který může být použit například pro účely pulmonální scintigrafie. Tato souprava zahrnuje první láhev obsahující polysacharid podle vynálezu, tedy polysacharid opatřený sekvestračními skupinami připojenými k tomuto polysacharidu kovalentními vazbami a vybranými mezi skupinami reprezentovanými vzorci



kde R představuje uhlovodíkovou nebo aromatickou skupinu zahrnující přinejmenším jeden atom síry a R' představuje vodíkový atom nebo alkylovou skupinu, jako například methylovou skupinu.

V provedení podle vynálezu může tento polysacharid existovat například ve formě mikročástic, které mohou například zaujímat tvar kulovitých mikročástic, kde tyto mikročástice vykazují schopnost existovat v lyofilizované formě nebo v suspenzi ve farmaceuticky přijatelné kapalině.

Kit podle tohoto vynálezu může dále zahrnovat druhou láhev obsahující chlorid cínatý, který ve výhodném provedení je v lyofilizované formě, nebo potom v případě, kdy je polysacharid v první láhvi přítomen v lyofilizované formě, například ve formě mikročástic, může tato první láhev dále obsahovat lyofilizovaný chlorid cínatý.

Kity (soupravy) podle tohoto vynálezu jsou stabilní přinejmenším po dobu dvanácti měsíců, jak bude demonstrováno v příkladech uvedených v dalším.

Radiofarmaceutický produkt podle tohoto vynálezu tedy prezentuje veškeré kvality vyžadované při použití v oblasti radiofarmaceutických aplikací, jako například v oblasti scintigrafie pulmonální perfúze nebo při radioterapii.

Další výhodné charakteristiky budou potom zřejmé při sledování následujících příkladů týkajících se tohoto vynálezu.

Příklady provedení vynálezu

V dalším bude podstata vynálezu blíže objasněna s pomocí konkrétních příkladů provedení, přičemž ovšem jsou tyto příklady pouze ilustrativní a nijak neomezují rozsah vynálezu.

P ř í k l a d 1

Byla připravena suspenze 10 gramů kukuřičného škrobu z lékopisu, předtím přesetého na sítěch o velikosti oka 10 μm a 40 μm , kde tato suspenze obsahovala přibližně 10%

17.05.00

vody, tedy 0,055 molu glukózy ve 100 mililitrech vody. Dále bylo přidáno 0,0168 molu jodistanu sodného (0,3 ekvivalentu) (NaIO_4), tedy 3,6 gramu, kde toto množství bylo rozpuštěno v 100 mililitrech vody. Tato suspenze byla poté míchána při pokojové teplotě po dobu 18 hodin. Vytvořený roztok byl zfiltrován a zoxidovaný škrob byl pětkrát propláchnut 20 mililitry vody a poté dvakrát propláchnut 50 mililitry acetonu. Získaný škrob byl vysušen za vakua, čímž bylo získáno 10 gramů škrobu zoxidovaného na 30% (výtěžek 100%).

Dále byla připravena suspenze 10 gramů škrobu zoxidovaného na 30% v 60 mililitrů směsi voda/ethanol o objemovém poměru 2/1. Poté bylo přidáno 0,1 ekvivalentu ($0,1 \times 0,055 \times 2$), tedy 0,011 molu, S-methyldithiokarbazátu ($\text{NH}_2\text{NH}(\text{C}=\text{S})\text{SCH}_3$), $M = 122$, tedy 1,34 gramu, kde toto množství bylo rozpuštěno v 10 mililitrech ethanolu. Vytvořená suspenze byla míchána při pokojové teplotě po dobu 18 hodin. Vytvořený roztok byl zfiltrován a modifikovaný škrob byl třikrát propláchnut 20 mililitry ethanolu a poté vysušen za vakua. Tímto způsobem bylo získáno přibližně 10 gramů modifikovaného škrobu. Elementární analýza práškovitého produktu ukázala obsah síry 5,4%, což odpovídá sedmiprocentní úrovni navázání S-methyldithiokarbazátu (DTCZ) (7 jednotek dithiokarbazátu na 100 teoretických aldehydových funkčních skupin, tedy 14 dithiokarbazátových jednotek na 100 jednotek glukózy). Výtěžek navázání tedy činil 70%. Tímto způsobem bylo tedy získáno 10 gramů škrobu zoxidovaného na 30% a ze 7% navázaného na DTCZ.

Značkovací reakce s $^{99\text{m}}\text{Tc}$:

Při realizaci značkovací reakce s techneciem $^{99\text{m}}\text{Tc}$ bylo 10 miligramů modifikovaného škrobu umístěno do láhve penicilinového typu. Poté byly přidány 4 mililitry

fyziologického séra, což bylo následováno přidáním 10 μg $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (20 μl roztoku o koncentraci 0,5 mg/ml připraveného v 0,1 N HCl). Poté byl přidán 1 mililitr roztoku $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ (5mc). Takto vytvořený roztok byl míchán po dobu 15 minut a kontrola radiochemické čistoty (RCP) byla provedena zfiltrováním 1 mililitr roztoku přes Millipore filtr o porozitě 0,22 μm , což bylo následováno propláchnutím filtru s pomocí 2 mililitrů fyziologického séra. Značkové kulovité mikročástice byly zadrženy na filtru na rozdíl od radioaktivních nečistot nenavázaných na tyto mikročástice, které byly zjištěny ve filtrátu. Radiochemická čistota potom odpovídá vztahu:

$$\text{RCP} = (\text{aktivita na filtru} / \text{celková aktivita}) \times 100.$$

V tomto případě dosahovala radiochemická čistota hodnoty 98,9%.

P ř í k l a d 2

Modifikace škrobu:

Při modifikaci škrobu zde byl aplikován obdobný postup jako v příkladu 1, přičemž ale v průběhu oxidační reakce bylo použito 0,2 ekvivalentu jodistanu. Tímto způsobem byl získán škrob zoxidovaný na 20%.

Adiční reakce byla rovněž provedena stejným způsobem jako v příkladu 1 a byl tedy získán škrob zoxidovaný na 20% a ze 7% navázaný na S-methyldithiokarbazát (DTCZ).

Značkovácí reakce s $^{99\text{m}}\text{Tc}$:

Značkovácí reakce s techneciem $^{99\text{m}}\text{Tc}$ zde byla rovněž provedena obdobným způsobem jako v příkladu 1. Radiochemická

17.05.03

čistota (RCP) v tomto případě dosahovala hodnoty 99%.

P ř í k l a d 3

Modifikace škrobu:

Při modifikaci škrobu zde byl aplikován obdobný postup jako v příkladu 1, přičemž ale v průběhu oxidační reakce bylo použito 0,1 ekvivalentu jodistanu. Tímto způsobem byl získán škrob zoxidovaný na 10%.

Adiční reakce byla rovněž provedena stejným způsobem jako v příkladu 1 a byl tedy získán škrob zoxidovaný na 10% a ze 7% navázaný na S-methyldithiokarbazát (DTCZ).

Značkovací reakce s ^{99m}Tc :

Značkovací reakce s techneciem ^{99m}Tc zde byla rovněž provedena obdobným způsobem jako v příkladu 1. Radiochemická čistota (RCP) v tomto případě dosahovala hodnoty 98,8%.

P ř í k l a d 4

Při modifikaci škrobu zde byl aplikován obdobný postup jako v příkladu 1, aby tak byl získán škrob zoxidovaný na 30%. Byla připravena suspenze 10 gramů škrobu zoxidovaného na 30% v 60 mililitrech směsi voda/ethanol o objemovém poměru 2/1. Poté bylo přidáno 0,1 ekvivalentu ($0,1 \times 0,055 \times 2$), tedy 0,011 molu, N-methyl-S-methyldithiokarbazátu ($\text{NH}_2\text{N}(\text{CH}_3)(\text{C}=\text{S})\text{SCH}_3$), $M = 136$, tedy 1,50 gramu, kde toto množství bylo rozpuštěno v 10 mililitrech ethanolu. Vytvořená suspenze byla míchána při pokojové teplotě po dobu 18 hodin. Vytvořený roztok byl zfiltrován a modifikovaný škrob byl třikrát propláchnut 20 mililitry ethanolu a poté vysušen za vakua. Tímto způsobem

17.05.02

bylo získáno přibližně 10 gramů modifikovaného škrobu. Elementární analýza práškovitého produktu ukázala obsah síry 5%, což odpovídá úrovni navázání N-methyl-S-methyldithiokarbazátu 6,5% (6,5 jednotek dithiokarbazátu na 100 teoretických aldehydových funkčních skupin, tedy 13 dithiokarbazátových jednotek na 100 jednotek glukózy). Výtěžek navázání tedy činil 65%.

Značkovací reakce s ^{99m}Tc :

Značkovací reakce s techneciem ^{99m}Tc zde byla rovněž provedena obdobným způsobem jako v příkladu 1. Radiochemická čistota (RCP) v tomto případě dosahovala hodnoty 95%.

P ř í k l a d 5

Modifikace škrobu:

Při modifikaci škrobu zde byl aplikován obdobný postup jako v příkladu 1, aby tak byl získán škrob zoxidovaný na 30%. Byla připravena suspenze 10 gramů škrobu zoxidovaného na 30% v 60 ml směsi voda/ethanol o objemovém poměru 2/1. Poté bylo přidáno 0,1 ekvivalentu ($0,1 \times 0,055 \times 2$), tedy 0,011 molu, 4-fenyl-3-thiosemikarbazidu $(\text{NH}_2\text{NH})(\text{C}=\text{S})\text{NH}(\text{C}_6\text{H}_5)$, $M = 167$, tedy 1,83 gramu, kde toto množství bylo rozpuštěno v 10 mililitrech ethanolu. Vytvořená suspenze byla míchána při pokojové teplotě po dobu 18 hodin. Vytvořený roztok byl zfiltrován a modifikovaný škrob byl třikrát propláchnut 20 mililitrech ethanolu a poté vysušen za vakua. Tímto způsobem bylo získáno přibližně 10 gramů modifikovaného škrobu. Elementární analýza práškovitého produktu ukázala obsah síry 3,16%, což odpovídá úrovni navázání 4-fenyl-3-thiosemikarbazidu 8% (8 jednotek thiosemikarbazidu na 100 teoretických aldehydových funkčních skupin, tedy 16 thiosemikarbazonových jednotek na 100

jednotek glukózy). Výtěžek navázání tedy činil 80%.

Značkovací reakce s ^{99m}Tc :

Značkovací reakce s techneciem ^{99m}Tc zde byla rovněž provedena obdobným způsobem jako v příkladu 1. Radiochemická čistota (RCP) v tomto případě dosahovala hodnoty 98%.

P ř í k l a d 6

Modifikace škrobu:

Při modifikaci škrobu zde byl aplikován obdobný postup jako v příkladu 1, aby tak byl získán škrob zoxidovaný na 30%. Byla připravena suspenze 10 gramů škrobu zoxidovaného na 30% v 60 ml směsi voda/ethanol o objemovém poměru 2/1. Poté bylo přidáno 0,1 ekvivalentu ($0,1 \times 0,055 \times 2$), tedy 0,011 molu, 4-methyl-3-thiosemikarbazidu $(\text{NH}_2\text{NH})(\text{C}=\text{S})\text{NH}(\text{CH}_3)$, $M = 105$, tedy 1,15 gramu, kde toto množství bylo rozpuštěno v 10 mililitrech ethanolu. Vytvořená suspenze byla třepána při pokojové teplotě po dobu 18 hodin. Vytvořený roztok byl zfiltrován a modifikovaný škrob byl třikrát propláchnut 20 mililitrů ethanolu a poté vysušen za vakua. Tímto způsobem bylo získáno přibližně 10 gramů modifikovaného škrobu. Elementární analýza práškovitého produktu ukázala obsah síry 2,9%, což odpovídá úrovni navázání 4-methyl-3-thiosemikarbazidu 7,3% (7,3 jednotek thiosemikarbazidu na 100 teoretických aldehydových funkčních skupin, tedy 14,6 thiosemikarbazonových jednotek na 100 jednotek glukózy). Výtěžek navázání tedy činil 73%.

Značkovací reakce s ^{99m}Tc :

Značkovací reakce s techneciem ^{99m}Tc zde byla rovněž provedena obdobným způsobem jako v příkladu 1. Radiochemická čistota (RCP) v tomto případě dosahovala hodnoty 97%.

P ř í k l a d 7

Modifikace škrobu:

Při modifikaci škrobu zde byl aplikován obdobný postup jako v příkladu 1, aby tak byl získán škrob zoxidovaný na 30%. Byla připravena suspenze 10 gramů škrobu zoxidovaného na 30% v 60 mililitrech směsi voda/ethanol o objemovém poměru 2/1. Poté bylo přidáno 0,1 ekvivalentu ($0,1 \times 0,055 \times 2$), tedy 0,011 molu,

4,4-dimethyl-3-thiosemikarbazidu ($\text{NH}_2\text{NH}(\text{C}=\text{S})\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $M = 119$, tedy 1,30 gramu, kde toto množství bylo rozpuštěno v 10 mililitrech ethanolu. Vytvořená suspenze byla míchána při pokojové teplotě po dobu 18 hodin. Vytvořený roztok byl zfiltrován a modifikovaný škrob byl třikrát propláchnut 20 mililitry ethanolu a poté vysušen za vakua. Tímto způsobem bylo získáno přibližně 10 gramů modifikovaného škrobu.

Elementární analýza práškovitého produktu ukázala obsah síry 3%, což odpovídá úrovni navázání

4,4-dimethyl-3-thiosemikarbazonu 7,5% (7,5 jednotek thiosemikarbazidu na 100 teoretických aldehydových funkčních skupin, tedy 15 thiosemikarbazonových jednotek na 100 jednotek glukózy). Výtěžek navázání tedy činil 75%.

Značkovací reakce s $^{99\text{m}}\text{Tc}$.

Značkovací reakce s techneciem $^{99\text{m}}\text{Tc}$ zde byla rovněž provedena obdobným způsobem jako v příkladu 1. Radiochemická čistota (RCP) v tomto případě dosahovala hodnoty 96%.

P ř í k l a d 8

Modifikace škrobu:

Při modifikaci škrobu zde byl aplikován obdobný postup jako v příkladu 1, aby tak byl získán škrob zoxidovaný na

30%. Byla připravena suspenze 10 gramů škrobu zoxidovaného na 30% v 60 ml směsi voda/ethanol o objemovém poměru 2/1. Poté bylo přidáno 0,1 ekvivalentu ($0,1 \times 0,055 \times 2$), tedy 0,011 molu, 4-allyl-3-thiosemikarbazidu $(\text{NH}_2\text{NH})(\text{C}=\text{S})\text{NH}(\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2)$, $M = 131$, tedy 1,44 gramu, kde toto množství bylo rozpuštěno v 10 mililitrech ethanolu. Vytvořená suspenze byla míchána při pokojové teplotě po dobu 18 hodin. Vytvořený roztok byl zfiltrován a modifikovaný škrob byl třikrát propláchnut 20 ml ethanolu a poté vysušen za vakua. Tímto způsobem bylo získáno přibližně 10 gramů modifikovaného škrobu. Elementární analýza práškovitého produktu ukázala obsah síry 3%, což odpovídá úrovni navázání 4-allyl-3-thiosemikarbazonu 7,5% (7,5 jednotek thiosemikarbazidu na 100 teoretických aldehydových funkčních skupin, tedy 15 thiosemikarbazonových jednotek na 100 jednotek glukózy). Výtěžek navázání tedy činil 75%.

Značkovací reakce s $^{99\text{m}}\text{Tc}$:

Značkovací reakce s techneciem $^{99\text{m}}\text{Tc}$ zde byla rovněž provedena obdobným způsobem jako v příkladu 1. Radiochemická čistota (RCP) v tomto případě dosahovala hodnoty 98%.

P ř í k l a d 9

Modifikace škrobu:

Při modifikaci škrobu zde byl aplikován obdobný postup jako v příkladu 1, aby tak byl získán škrob zoxidovaný na 30%. Byla připravena suspenze 10 gramů škrobu zoxidovaného na 30% v 60 ml směsi voda/ethanol o objemovém poměru 2/1. Poté bylo přidáno 0,1 ekvivalentu ($0,1 \times 0,055 \times 2$), tedy 0,011 molu, 3-thiosemikarbazidu $(\text{NH}_2\text{NH})(\text{C}=\text{S})\text{NH}_2$, $M = 91$, tedy 1 gramu, kde toto množství bylo rozpuštěno v 10 mililitrech ethanolu. Vytvořená suspenze byla míchána při

pokožkové teplotě po dobu 18 hodin. Vytvořený roztok byl zfiltrován a modifikovaný škrob byl třikrát propláchnut 20 ml ethanolu a poté vysušen za vakua. Tímto způsobem bylo získáno přibližně 10 gramů modifikovaného škrobu.

Elementární analýza práškovitého produktu ukázala obsah síry 2,9%, což odpovídá úrovni navázání 3-thiosemikarbazonu 7,3% (7,3 jednotek thiosemikarbazidu na 100 teoretických aldehydových funkčních skupin, tedy 14,6 thiosemikarbazonových jednotek na 100 jednotek glukózy). Výtěžek navázání tedy činil 73%.

Značkovací reakce s ^{99m}Tc :

Značkovací reakce s techneciem ^{99m}Tc zde byla rovněž provedena obdobným způsobem jako v příkladu 1. Radiochemická čistota (RCP) v tomto případě dosahovala hodnoty 95%.

P ř í k l a d 10

Modifikace škrobu:

Při modifikaci škrobu zde byl aplikován obdobný postup jako v příkladu 1, aby tak byl získán škrob zoxidovaný na 30%. Byla připravena suspenze 10 gramů škrobu zoxidovaného na 30% v 60 mililitrech směsi voda/ethanol o objemovém poměru 2/1. Poté bylo přidáno 0,1 ekvivalentu ($0,1 \times 0,055 \times 2$), tedy 0,011 molu, 2-aminothiofenolu ($\text{C}_6\text{H}_4(\text{NH}_2)(\text{SH})$, $M = 125$, tedy 1,37 gramu, kde toto množství bylo rozpuštěno v 10 mililitrech ethanolu. Vytvořená suspenze byla míchána při pokojové teplotě po dobu 18 hodin. Vytvořený roztok byl zfiltrován a modifikovaný škrob byl třikrát propláchnut 20 mililitry ethanolu a poté vysušen za vakua. Tímto způsobem bylo získáno přibližně 10 gramů modifikovaného škrobu. Elementární analýza práškovitého produktu ukázala obsah síry 3%, což odpovídá úrovni navázání

2-aminothiofenolu 7,5% (7,5 jednotek aminothiofenolu na 100 teoretických aldehydových funkčních skupin, tedy 15 aminothiofenolových jednotek na 100 jednotek glukózy). Výtěžek navázání tedy činil 75%.

Značkovací reakce s ^{99m}Tc :

Značkovací reakce s techneciem ^{99m}Tc zde byla rovněž provedena obdobným způsobem jako v příkladu 1. Radiochemická čistota (RCP) v tomto případě dosahovala hodnoty 94%.

P ř í k l a d 11

Při modifikaci škrobu zde byl aplikován obdobný postup jako v příkladu 1, aby tak byl získán škrob zoxidovaný na 30%. Byla připravena suspenze 10 gramů škrobu zoxidovaného na 30% v 60 ml směsi voda/ethanol o objemovém poměru 2/1. Poté bylo přidáno 0,1 ekvivalentu ($0,1 \times 0,055 \times 2$), tedy 0,011 molu, 2-merkptoethylaminu (nebo 2-aminoethanthiolu) ($\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SH}$), $M = 91$, tedy 1 gram, kde toto množství bylo rozpuštěno v 10 mililitrech ethanolu. Vytvořená suspenze byla míchána při pokojové teplotě po dobu 18 hodin. V dalším kroku bylo přidáno 0,015 molu tetrahydridoboritanu sodného (NaBH_4), aby tak došlo k redukci vytvořené Schiffovy báze a její stabilizaci (nearomatické Schiffovy báze nejsou stabilní) a směs byla ponechána reagovat po dobu jedné hodiny. Vytvořený roztok byl zfiltrován a modifikovaný škrob byl třikrát propláchnut 20 mililitry ethanolu a poté vysušen za vakua. Tímto způsobem bylo získáno přibližně 10 gramů modifikovaného škrobu. Elementární analýza práškovitého produktu ukázala obsah síry 3,4%, což odpovídá úrovni navázání 2-merkptoethylaminu 8,5% (8,5 jednotek 2-merkptoethylaminu na 100 teoretických aldehydových funkčních skupin, tedy 17 2-merkptoethylaminových jednotek

17.05.02

na 100 jednotek glukózy). Výtěžek navázání tedy činil 85%.

Značkovací reakce s ^{99m}Tc :

Značkovací reakce s techneciem ^{99m}Tc zde byla rovněž provedena obdobným způsobem jako v příkladu 1. Radiochemická čistota (RCP) v tomto případě dosahovala hodnoty 95%.

P ř í k l a d 12

Modifikace škrobu:

Při modifikaci škrobu zde byl aplikován obdobný postup jako v příkladu 1, aby tak byl získán škrob zoxidovaný na 30%. Byla připravena suspenze 10 gramů škrobu zoxidovaného na 30% v 60 mililitrech směsi voda/ethanol o objemovém poměru 2/1. Poté bylo přidáno 0,1 ekvivalentu ($0,1 \times 0,055 \times 2$), tedy 0,011 molu, 2-amino-4-merkaptotriazolu ($\text{C}_4\text{N}_2\text{H}(\text{SH})(\text{NH}_2)$), $M = 116$, tedy 1,27 gramu, kde toto množství bylo rozpuštěno v 10 mililitrech ethanolu. Vytvořená suspenze byla míchána při pokojové teplotě po dobu 18 hodin. Vytvořený roztok byl zfiltrován a modifikovaný škrob byl třikrát propláchnut 20 ml ethanolu a poté vysušen za vakua. Tímto způsobem bylo získáno přibližně 10 gramů modifikovaného škrobu. Elementární analýza práškovitého produktu ukázala obsah síry 2,8%, což odpovídá úrovni navázání 2-amino-4-merkaptotriazolu 7% (7 jednotek merkaptotriazolu na 100 teoretických aldehydových funkčních skupin, tedy 14 merkaptotriazolových jednotek na 100 jednotek glukózy). Výtěžek navázání tedy činil 75%.

Značkovací reakce s ^{99m}Tc :

Značkovací reakce s techneciem ^{99m}Tc zde byla rovněž provedena obdobným způsobem jako v příkladu 1. Radiochemická

čistota (RCP) v tomto případě dosahovala hodnoty 85%.

S r o v n á v a c í p ř í k l a d 1

Bylo použito 10 gramů prosetého lékopisného kukuřičného škrobu, který neprošel chemickou transformací a pro značkování tohoto škrobu techneciem ^{99m}Tc byla použita stejná procedura jako v příkladu 1.

Radiochemická čistota (RCP) v tomto případě dosahovala hodnoty 19%.

Tento příklad je tedy dobrou demonstrací skutečnosti, že chemická modifikace (fixace sekvestračních skupin) provedená způsobem podle tohoto vynálezu je nezbytná pro umožnění značkování techneciem ^{99m}Tc . Pokud jsou mikročástice značkovány bez předchozí chemické transformace, potom navíc není možné dosáhnout trvalejšího pulmonálního zachytu, v protikladu s použitím produktu v provedení podle tohoto vynálezu. Tyto výsledky jsou proto v rozporu se zjištěním, které je popsáno v dokumentu FR-A-2 273 516.

P ř í k l a d 13

Celulozová modifikace:

Při modifikaci celulózy zde byl aplikován obdobný postup jako v příkladu 1, přičemž ale byla použita celulóza přisetá mezi síty o velikosti oka 10 μm a 40 μm . Tímto způsobem bylo tedy získáno 10 gramů celulozy zoxidované na 30% a ze 7% navázaného na DTCZ.

Značkovací reakce s ^{99m}Tc :

Značkovací reakce s techneciem ^{99m}Tc zde byla rovněž

provedena obdobným způsobem jako v příkladu 1. Radiochemická čistota (RCP) v tomto případě dosahovala hodnoty 99,1%.

P ř í k l a d 14

Experimentální krysy typu Sprague Dawley o hmotnosti přibližně 200 gramů byly anestetizovány s pomocí thiopentalu sodného a poté jim byly intravenózním způsobem aplikovány různé roztoky kulovitých mikročástic značkových techneciem ^{99m}Tc podle příkladů 1 až 9 a příkladu 13. Každému zvířeti bylo aplikováno 0,2 mililitru roztoku do žíly penisu, tedy 0,2 mc na jedno zvíře. Zvířata byla poté umístěna pod zařízení pro snímání gama záření a po dobu 3 hodin byly postupně získávány statické snímky. Tímto způsobem byly získány po sobě následující snímky, přičemž na jeden snímek bylo použito 15 000 zobrazení. Poté byly manuálně definovány zájmové zóny, aby tak mohla být odhadnuta aktivita přítomná v různých orgánech 15 minut následně po intravenózní aplikaci. Získané výsledky jsou uvedeny v tabulce I.

Tabulka I: Výsledky

% aktivity 15 minut po aplikaci	Př. 1	Př. 2	Př. 3	Př. 4	Př. 5
% pulmon. aktivity	90%	85%	80%	80%	85%
% hepat. aktivity	< 5%	< 5%	< 5%	< 10%	< 10%
pulmon. poločas rozpadu	2 hod.	1 hod.	30 min.	2 hod.	2 hod.

% aktivity 15 minut po aplikaci	Př. 6	Př. 7	Př. 8	Př. 9	Př. 10
% pulmon. aktivity	85%	85%	85%	85%	90%
% hepat. aktivity	< 5%	< 5%	< 5%	< 5%	< 5%
pulmon. poločas rozpadu	2 hod.	2 hod.	2 hod .	2 hod.	> 4 hod.

Je tedy zřejmé, že modifikované kulovité mikročástice vykazují velmi dobrý pulmonální záchyt. Navíc je možné modulovat rychlost pulmonální eliminace tím, že jsou prováděny změny v úrovni oxidace, jak je ukázáno v příkladech 1, 2 a 3 (oxidační úrovně 30%, 20% a 10%).

Použití celulózy umožňuje značné prodloužení rychlosti eliminace (příklad 10, poločas rozpadu > 4 hodiny).

S r o v n á v a c í p ř í k l a d 2

V tomto příkladu nebyl použit přírodní škrob, ale kulovité mikročástice připravené z amyl-pektinu zesíťného epichlorhydrinem, jak je popsáno v patentu FR-A-2 273 516.

Příprava zesíťných mikrokuliček škrobu:

Při přípravě zesíťných škrobových mikročástic bylo rozpuštěno 8 gramů kukuřičného amyl-pektinu ve 40 mililitrů roztoku obsahujícího 4 gramů NaOH a 0,15 gramu tetrahydridoboritanu sodného. Amyl-pektin byl ponechán k rozpuštění po dobu 24 hodin. Následně byla mícháním 60 ml tekutého parafinu a 1,6 gramu sojového lecitinu rozpuštěného

17.05.00

ve 4 mililitrech hexanu připravena emulze, kde toto míchání bylo prováděno při rychlosti 800 otáček za minutu. Poté byla přidána vodná fáze obsahující amyl-pektin, což bylo následováno přidáním 3,2 mililitru epichlorhydrinu. Vytvořená emulze byla po dobu 4 hodin zahřívána na teplotu 55 °C a poté přes noc ponechána v míchaném stavu. Získané kulovité mikročástice vykazující velikost přibližně 50 µm byly třikrát propláchnuty 250 mililitry acetonu, vysušeny a posléze lyofilizovány.

Značkovací reakce s ^{99m}Tc :

Značkovací reakce s techneciem ^{99m}Tc zde byla rovněž provedena obdobným způsobem jako v příkladu 1, ale s použitím 1 miligramů $\text{SnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Radiochemická čistota (RCP) v tomto případě dosahovala hodnoty 90%.

Modifikace škrobu:

Při modifikaci škrobu zde byl aplikován obdobný postup jako v příkladu 1, přičemž bylo ale použito 10 gramů kulovitých mikročástic amylopektinu zesítěného dříve připraveným epichlorhydrinem. Tímto způsobem bylo tedy získáno 10 gramů kulovitých mikročástic amyl-pektinu zoxidovaného na 30% a ze 7% navázaného na DTCZ.

Značkovací reakce s ^{99m}Tc :

Značkovací reakce s techneciem ^{99m}Tc zde byla rovněž provedena obdobným způsobem jako v příkladu 1. Radiochemická čistota (RCP) v tomto případě dosahovala hodnoty 99%.

P ř í k l a d 15

Zde byl sledován stejný postup provedení jako v příkladu 14, aby tak byly testovány kulovité mikročástice

zesítěného amylopektinu značkované techneciem ^{99m}Tc podle srovnávacího příkladu 2. Získané výsledky jsou uvedeny v tabulce II.

Tabulka II

% aktivity 15 minut po aplikaci	Srovnávací příklad 2	Příklad 17
% pulmon. aktivity	< 10%	85%
% hepat. aktivity	70%	< 5%
pulmon. poločas rozpadu	-- -	2 hod.

Je tedy zřejmé, že v rozporu s popisem uvedeným v dokumentu FR-A-2 273 516 byly mikročástice zesítěného, chemicky nemodifikovaného amyl-pektinu značkovány techneciem ^{99m}Tc , ale nevykazovaly žádný pulmonální záchyt, kde příčinou byla bezpochyby slabá vazba mezi techneciem ^{99m}Tc a těmito mikročásticemi. Tyto mikročástice, které byly ovšem chemicky transformovány postupem podle vynálezu, potom na druhé straně ukázaly dobrou úroveň pulmonálního záchytu.

P ř í k l a d 16

Kulovité mikročástice škrobu připravené postupem podle příkladu 1 (škrob zoxidovaný na 30% a ze 7% navázaný na DTCZ) byly použity pro vytvoření sterilní značkovací soupravy a byly připraveny pro značkování techneciem ^{99m}Tc .

17.05.02

Sterilizace mikrokuliček:

Při sterilizaci mikročástic bylo 10 gramů těchto mikročástic umístěno do zúžené láhve a poté ozařováno, kde jako zdroj záření byl použit kobalt-60. Tyto mikročástice obdržely v průběhu 20 hodin celkovou dávku gama záření 25 kGy.

Při přípravě souprav bylo 200 miligramů sterilizovaných mikročástic sterilním způsobem umístěno do reaktoru obsahujícího 20 mililitrů NaCl 9/1000. Tento roztok byl odvzdušněn probubláváním dusíku a poté bylo přidáno 400 μ l sterilního roztoku $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ při koncentraci 0,5 mg/ml v 0,1N HCl. Poté byl oddělen 1 mililitr tohoto roztoku pro každou z dvaceti lahví, které byly následně lyofilizovány a umístěny do dusíkové atmosféry.

Každá z těchto lahví tedy obsahovala:

10 mg modifikovaných kulovitých mikročástic

10 μ g $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

9 mg NaCl

Značkovací reakce s $^{99\text{m}}\text{Tc}$:

Při provádění značkovací reakce s techneciem $^{99\text{m}}\text{Tc}$ bylo 5 ml roztoku TcO_4^- (5 mc) přidáno do lahve v lyofilizované formě a ponecháno reagovat po dobu 15 minut. Dále bylo postupováno obdobným způsobem jako v příkladu 1. Radiochemická čistota (RCP) v tomto případě dosahovala hodnoty 98,7%.

Testování stability kitu:

Při testování stability kitu (soupravy) byly značkovací kity připravené výše specifikovaným způsobem přechovávány při různých teplotách a poté byla testována

značkovací reakce s techneciem ^{99m}Tc , aby tak byla vyhodnocena stabilita těchto souprav. Získané výsledky jsou uvedeny v tabulce III:

Tabulka III: RCP (%)

Teplota přechovávání	6 měsíců	12 měsíců
2 - 8°C	98,5%	98,4%
25°C	97%	96%
45°C	94%	90%

Z uvedených výsledků je zřejmá velmi vysoká stabilita soupravy přechovávané při teplotě pohybující se v rozmezí od 2 °C do 8 °C.

P ř í k l a d 17

Experimentální krysy typu Sprague Dawley o hmotnosti přibližně 200 gramů byly anestetizovány s pomocí thiopentalu sodného a poté jim byly intravenózním způsobem aplikovány různé roztoky kulovitých mikročástic značkových techneciem ^{99m}Tc obdobně jako v příkladu 14. Každému zvířeti bylo aplikováno 0,2 ml roztoku do žíly penisu, tedy 0,2 mc na jedno zvíře. Zvířata byla 15 minut po aplikaci usmrcena. Poté byly získány různé orgány, bylo provedeno měření úrovně radioaktivity přítomné v každém orgánu a byl určen procentuální podíl aktivity přítomné v každém orgánu. Zjištěné výsledky jsou ukázány v tabulce IV:

Tabulka IV: Procentuální podíl aplikované dávky 15 minut po aplikaci

Orgán	Příklad 1	Příklad 13
Krev (1 ml)	0,1%	0,2%
Játra	2,2%	5,6%
Ledviny	0,4%	0,4%
Plíce	91%	82%
Slezina	0,1%	0,1%
Střevo	1,5%	0,7%
Močový měchýř	0,1%	1,3%

Z uvedených výsledků je tedy pro mikročástice přírodního škrobu, stejně jako pro zesíťené mikročástice na bázi škrobu, zřejmý velmi vysoký pulmonální zachyt, zatímco zachyt v ostatních orgánech byl slabý. Sterilní produkt připravený ve formě soupravy se tedy zdá být zcela adaptován na použití jako radiofarmaceutický produkt pro oblast pulmonální perfúze, kde může nahradit albumin, a také pro oblast radioterapie.

P ř í k l a d 18

V tomto příkladu byla použita celulóza zoxidovaná na 30% a ze 7% navázaná na DTCZ obdobně jako v příkladu 13. Takto modifikovaná celulóza byla značkována s pomocí rhenia 186, aby tak byla ilustrována použitelnost nosného materiálu podle vynálezu pro terapeutické účely.

Při realizaci značkovací reakce s rheniem 186 bylo 10

miligramů modifikované celulózy umístěno do láhve penicilinového typu. Poté byly přidány 2 mililitry fyziologického séra, což bylo následováno přidáním 20 miligramů kyseliny citronové a posléze přidáním 1 miligram $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (100 μl roztoku o koncentraci 10 mg/ml připraveného v 0,1 N HCl).

Poté bylo k obsahu lahve přidáno 0,1 mililitru roztoku ReO_4^- , odpovídajícího aktivitě 2 mc. Láhev byla poté po dobu 30 minut zahřívána na vodní lázni při teplotě 100 °C. Radiochemická čistota (RCP) byla určena zfiltrováním přes Millipore filtr obdobně jako v příkladu 1. V tomto případě dosahovala radiochemická čistota hodnoty 92%.

Pro posouzení stability vazby mezi rheniem 186 a mikročásticemi celulózy byl proveden test stability v uspořádání in vitro.

Vytvořená směs byla inkubována s pomocí HSA (albumin lidského séra) při koncentraci 20 mg/ml při teplotě 37 °C. Tímto způsobem byly získány výsledky ukázané v následující tabulce:

Inkubační doba	0	2 hod	6 hod	24 hod	48 hod
RCP	92%	92%	91%	89%	90%

Uvedené výsledky prokázaly velmi vysokou stabilitu značkování celulóзовých mikročástic rheniem 186 a vysokou stabilitu mikročástic samotných.

Pro odborníka pracujícího v daném oboru je zřejmé, že

tyto výsledky mohou být extrapolovány směrem k využití rhenia 188.

P ř í k l a d 19

Experimentální krysy typu Sprague Dawley o hmotnosti přibližně 200 gramů byly anestetizovány a poté bylo každému zvířeti aplikováno 0,2 mililitru (0,1 mc) roztoku celulóзовých mikročástic značkových rheniem Re 186 obdobně jako v příkladu 18.

Zvířata byla poté umístěna pod zařízení pro snímání gama záření a po dobu 48 hodin byly získávány snímky.

Aktivity přítomné v zájmových zónách byly poté vypočítány obdobným způsobem jako v příkladu 14.

čas po aplikaci	1 hod	2 hod	6 hod	24 hod	48 hod
% pulmon. aktivity	80%	85%	85%	85%	90%
% hepat. aktivity	< 5%	< 5%	< 5%	< 5%	< 5%

Tyto výsledky tedy dokazují, že aktivita zůstává blokována na pulmonální úrovni přinejmenším po dobu 48 hodin. Tento typ kulovitých mikročástic tedy může být použit pro terapeutické účely.

Nejvýznamnějším klinickým využitím může být léčba jaterních nádorů následně po injekční aplikaci, nikoli intravenózním způsobem, ale přímo do jaterní artérie (metabolická radioterapie).

17.05.02

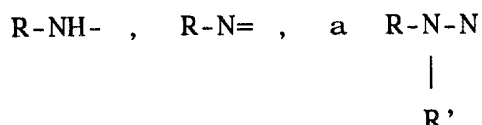
Další možný způsob využití spočívá v podkožní injekční aplikaci tohoto typu částic do prsního nádoru. Částice migrující lymfatickým systémem mohou umožňovat léčbu uzlin napadených rakovinnými buňkami.

17.05.02

2002-782

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Radiofarmaceutický produkt vyznačující se tím, že zahrnuje polysacharid opatřený sekvestračními skupinami připojenými k tomuto polysacharidu kovalentními vazbami a vybraným ze skupiny funkčních skupin representovaných vzorci



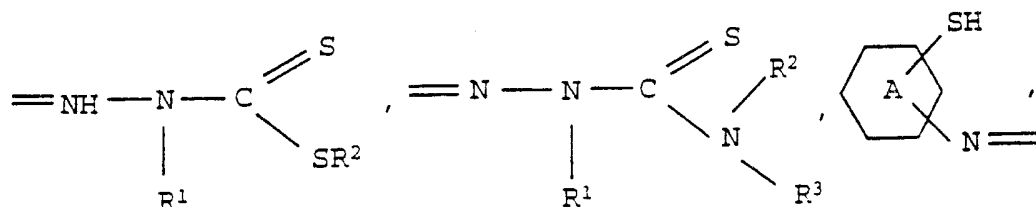
ve kterých:

R představuje uhlovodíkovou nebo aromatickou skupinu zahrnující přinejmenším jeden atom síry a

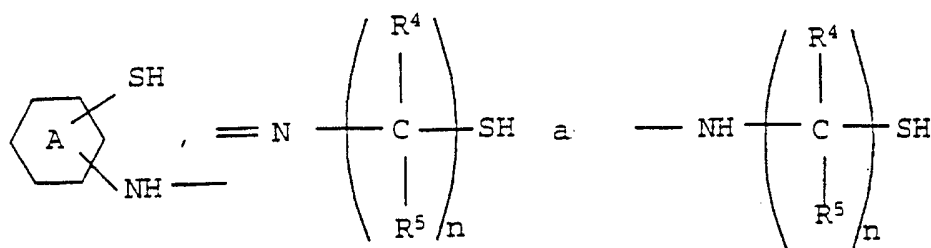
R' představuje vodíkový atom nebo alkylovou skupinu nebo methylovou skupinu,

kde tyto sekvestrační skupiny vytvářejí komplex chelátového typu s radioaktivním kovem vybraným ze skupiny zahrnující technecium, rhenium, měď, yttrium, erbium, galium a samarium, kde tento polysacharid je přítomen ve formě mikročástic.

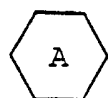
2. Radiofarmaceutický produkt podle nároku 1 vyznačující se tím, že tyto sekvestrační skupiny jsou vybrány ze souboru reprezentovaného obecnými vzorci:



17.05.02



kde R^1 , R^2 , R^3 , R^4 a R^5 představují nezávisle vodíkové atomy, nasycené nebo nenasycené uhlovodíkové skupiny, karboxylové skupiny nebo aromatické skupiny,

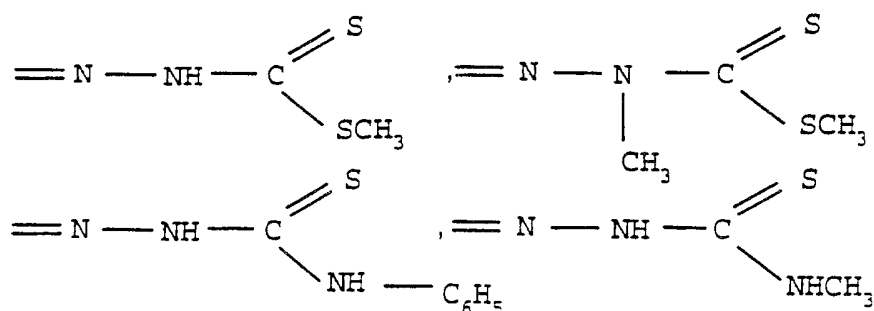


představuje aromatické jádro, které

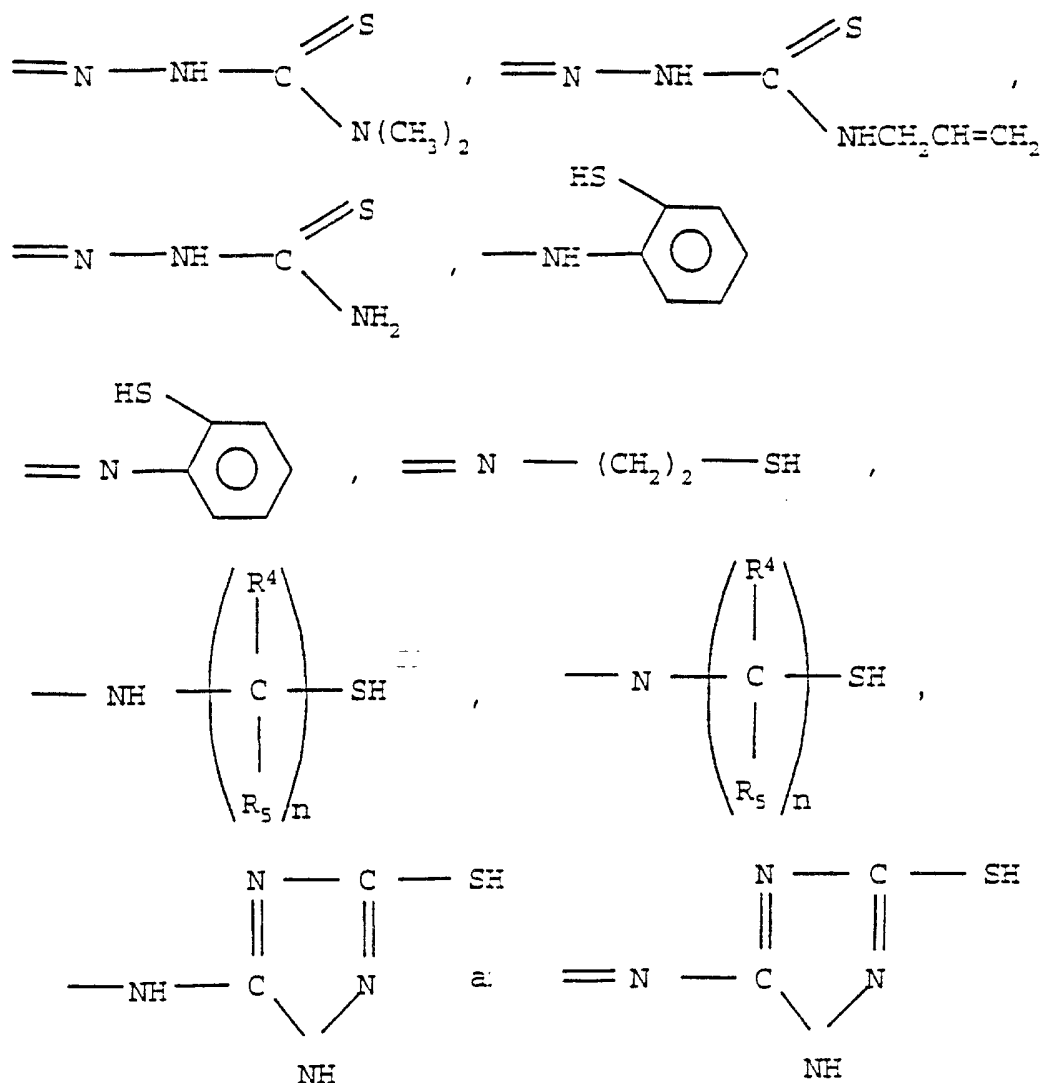
případně může obsahovat jeden nebo několik heteroatomů,
a

n představuje celé číslo pohybující se v rozmezí od jedné do pěti.

3. Radiofarmaceutický produkt podle nároku 2
vyznačující se tím, že tyto sekvestrační skupiny jsou
vybrány ze skupin reprezentovaných obecnými vzorci:



17.05.02



4. Radiofarmaceutický produkt podle kteréhokoli z nároků 1 až 3 vyznačující se tím, že polysacharid je vybrán ze skupiny látek zahrnující přírodní škrob, celulózu a zesítěný amyl-pektin.

5. Radiofarmaceutický produkt podle kteréhokoli z nároků 1 až 5 vyznačující se tím, že mikročástice vykazují velikost pohybující se v rozmezí od 0,01 μm do 100 μm .

6. Radiofarmaceutický produkt podle kteréhokoli z nároků 1 až 5 vyznačující se tím, že zastoupení sekvestračních skupin se při vztažení na sacharidové struktury polysacharidu pohybuje v rozmezí od 0,1% do 50%.

7. Použití radiofarmaceutického produktu podle kteréhokoli z nároků 1 až 6, ve kterém jako radioaktivní kov je použito technecium ^{99m}Tc nebo galium ^{67}Ga , aby tak byl připraven produkt určený pro diagnostické účely.

8. Použití radiofarmaceutického produktu podle kteréhokoli z nároků 1 až 6, ve kterém jako radioaktivní kov je použito rhenium-186 nebo rhenium-188, měď-64 nebo měď-67, yttrium-90, erbium-169 nebo samarium-153, aby tak bylo připraveno léčivo.

9. Použití radiofarmaceutického produktu podle kteréhokoli z nároků 1 až 7, ve kterém jako radioaktivní kov je použito technecium ^{99m}Tc , aby tak byl připraven produkt určený pro techniku pulmonální scintigrafie.

10. Radiofarmaceutický produkt podle kteréhokoli z nároků 1 až 6 vyznačující se tím, že existuje ve formě suspenze kulovitých mikročástic ve fyziologicky přijatelném kapalném médiu nebo v lyofilizované formě.

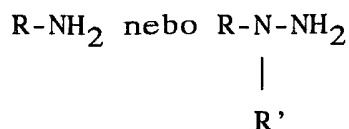
11. Způsob přípravy radiofarmaceutického produktu podle kteréhokoli z nároků 1 až 6 vyznačující se tím, že zahrnuje následující kroky:

(a) přivedení polysacharidu k oxidaci provedené s pomocí jodistanu,

(b) přivedení zoxidovaného polysacharidu k reakci se

17.05.02

sloučeninou obsahující primární aminovou funkční skupinu
nebo hydrazin reprezentovaný vzorcem

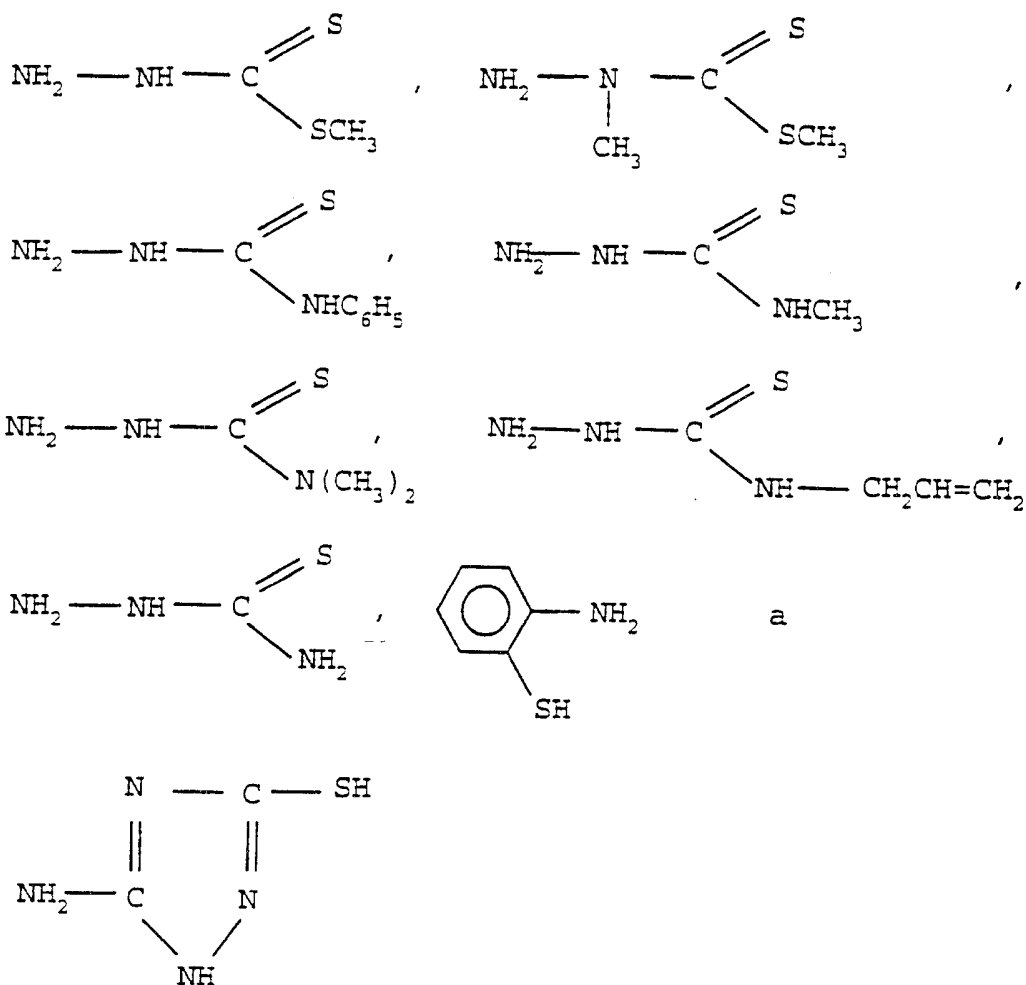


kde R představuje uhlovodíkovou nebo aromatickou skupinu zahrnující přinejmenším jeden atom síry,
aby tak k tomuto polysacharidu mohly být kovalentním způsobem navázány skupiny vykazující sekvestrační schopnost vůči kovům a představované vzorci R-NH-, R-N= nebo R-NH-N=, zatímco R' představuje vodíkový atom nebo alkylovou skupinu nebo methylovou skupinu,

(c) přivedení polysacharidu nesoucího sekvestrační skupiny k reakci se solí radioaktivního kovu vybraného ze skupiny kovů zahrnující technecium, rhenium, měď, yttrium, erbium a samarium.

12. Způsob podle nároku 11 vyznačující se tím, že sloučenina obsahující primární aminovou funkční skupinu odpovídá vzorci $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_n-\text{SH}$, kde n představuje celé číslo pohybující se v rozmezí od jedné do pěti, přičemž v rámci daného způsobu může být mezi krokem (b) a krokem (c) zahrnut dodatečný krok redukce této sloučeniny provedený s pomocí tetrahydridoboritanu sodného.

13. Způsob podle nároku 11 vyznačující se tím, že sloučenina navázaná na zoxidovaný polysacharid odpovídá jednomu z následujících vzorců:



14. Způsob podle kteréhokoli z nároků 11 až 13 vyznačující se tím, že obsah sekvestračních skupin fixovaných na polysacharidu je regulován řízením úrovně oxidace polysacharidu ve výše zmíněném kroku (a).

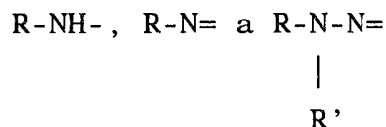
15. Způsob podle nároku 14 vyznačující se tím, že úroveň oxidace polysacharidu se pohybuje v rozmezí od 10% do 50%.

17.05.02

16. Způsob podle nároku 14 vyznačující se tím, že obsah sekvestračních skupin se pohybuje v rozmezí od 2% do 15%.

17. Způsob podle kteréhokoli z nároků 10 až 16 vyznačující se tím, že krok (c) spočívá v přivedení kulovitých mikročástic polysacharidu zahrnujícího sekvestrační skupiny do kontaktu s roztokem technecistanu $^{99m}\text{TcO}_4^-$ v přítomnosti redukčního činidla.

18. Diagnostický kit použitelný pro techniku pulmonální scintigrafie vyznačující se tím, že zahrnuje první láhev obsahující polysacharid opatřený sekvestračními skupinami připojenými k tomuto polysacharidu kovalentními vazbami a vybranými mezi skupinami representovanými vzorci



kde R představuje uhlovodíkovou nebo aromatickou skupinu zahrnující přinejmenším jeden atom síry a R' představuje vodíkový atom nebo alkylovou skupinu nebo methylovou skupinu, přičemž tento polysacharid existuje ve formě lyofilizovaných mikročástic nebo v suspenzi ve farmaceuticky přijatelné kapalině.

19. Kit podle nároku 18 vyznačující se tím, že dále zahrnuje druhou láhev obsahující chlorid cínatý v lyofilizované formě.

20. Kit podle nároku 18 vyznačující se tím, že tento polysacharid je přítomen ve formě lyofilizovaných mikročástic v první láhvi, kde tato první láhev rovněž

17.05.02

obsahuje lyofilizovaný chlorid cínatý.