

12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

22) Date de dépôt : 20.11.92.

30) Priorité :

43) Date de la mise à disposition du public de la demande : 27.05.94 Bulletin 94/21.

56) Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du présent fascicule.*

60) Références à d'autres documents nationaux apparentés :

71) Demandeur(s) : CIS BIO INTERNATIONAL — FR.

72) Inventeur(s) : Pasqualini Roberto et Moisan Annick.

73) Titulaire(s) :

74) Mandataire : Brevatome.

54) Procédé de marquage cellulaire au moyen de complexes nitruro-bis (dithiocarbamato)Tc-99m et trousse pour la mise en œuvre de ce procédé.

57) L'invention concerne un procédé de marquage cellulaire, en particulier des leucocytes, au moyen de complexes nitruro bis(dithiocarbamato)^{99m}Tc.

Selon l'invention, on utilise un produit radiopharmaceutique comprenant un complexe nitruro bis(N,éthoxy-N,éthylthiocarbamato) ou (N-diéthylthiocarbamato)^{99m}Tc préparé de préférence par un procédé comprenant 1) la réaction d'un composé oxygéné de ^{99m}Tc avec un premier ligand azoté et un agent réducteur, puis 2) la réaction du produit intermédiaire ainsi obtenu avec au moins un composé de formule:

dans laquelle R¹ représente le groupe éthyle ou éthoxy, R² est un ion de métal pharmaceutiquement acceptable de valence n, N⁺ ou NH₄⁺ avec n=1.

Par addition du produit radiopharmaceutique à une suspension de cellules telles que des leucocytes ou granulocytes, on obtient une suspension de cellules marquées avec un taux de marquage et une stabilité élevés, utilisable pour le diagnostic et la localisation des sites inflammatoires ou infectieux.

FR 2 698 272 - A1



Procédé de marquage cellulaire au moyen de complexes nitruro-bis (dithiocarbamato) Tc-99m et trousse pour la mise en oeuvre de ce procédé.

5 La présente invention a pour objet un procédé de marquage cellulaire utilisant des complexes nitruro bis(dithiocarbamato) Tc-99m.

10 De façon plus précise, elle concerne le marquage des cellules du sang telles que les leucocytes, plus particulièrement les granulocytes, en vue de la localisation anatomique des sites inflammatoires et des foyers infectieux.

15 La détection précoce et précise des complications infectieuses post-chirurgicales, des infections dues à des blessures profondes après traumatisme et des appendicites, revêt une importance stratégique pour le clinicien, car elle permet de déclencher une thérapie précoce, clinique ou chirurgicale.

20 Les techniques radioisotopiques actuellement utilisées pour la détection des sites inflammatoires sont :

- 25 - la scintigraphie avec le citrate de gallium (^{67}Ga),
- le marquage des leucocytes par le ^{111}In -oxinate ou le ^{111}In -tropolonate,
- le marquage des leucocytes par le $^{99\text{m}}\text{Tc}$ via l'injection phagocytaire de colloïdes,
- 30 - le marquage des leucocytes par le $^{99\text{m}}\text{Tc}$ via l'accumulation d'un complexe neutre de technétium tel que le $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -hexaméthylpropylèneamineoxime (Tc-HMPAO), et
- le marquage des leucocytes par des anticorps radiomarqués (antigranulocytes).

35

La technique utilisant le citrate de gallium présente certains inconvénients. En effet, en raison de la lente accumulation du ^{67}Ga , plus de 24h sont nécessaires entre l'injection et l'imagerie ; par ailleurs, la captation intestinale du citrate de ^{67}Ga exclut son utilisation dans la recherche des infections abdominales.

Les techniques utilisant l'oxinate ou le tropolonate d'indium sont satisfaisantes mais ont l'inconvénient de délivrer une dose d'irradiation élevée aux patients et d'être très onéreuses en raison du coût élevé du radioisotope.

Les techniques utilisant le marquage des leucocytes via l'injection phagocytaire de colloïdes nécessitent une activation préliminaire des cellules qui conduit à une captation précoce du traceur dans les poumons.

Les techniques utilisant le marquage de cellules au moyen d'anticorps antigranulocytes se heurtent au problème de la nature murine des anticorps disponibles aujourd'hui qui peuvent induire chez l'homme une réaction immunitaire avec formation d'anticorps humains anti-souris (HAMA).

Les techniques utilisant des complexes neutres de technétium sont donc plus intéressantes, mais dans le cas du complexe $^{99\text{m}}\text{Tc-HMPAO}$, connu comme traceur de perfusion cérébrale et comme marqueur des leucocytes par passage à travers la membrane cellulaire et fixation dans le cytoplasme, la préparation du complexe pose certains problèmes car la solution de $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ doit être exempte d'entraîneur et le produit marqué n'est stable que 30min après sa préparation. La préparation de ce complexe et son utilisation pour le marquage

de leucocytes sont décrits en particulier par Becker W et al dans Nucl. Med. Comm., 9, 1988, p. 435-447, par Danpure H.J. et al dans Nucl. Med. Comm., 9, 1988, p. 465-475, et par Kelbaek H et al dans
5 Eur. J. Nucl. Med., 14, 1988, p. 621-623.

Aussi, on a envisagé récemment d'utiliser d'autres complexes neutres de technétium du type nitruro bis(dithiocarbamato) technétium(V) comme
10 il est décrit par Abram et Beyer dans Isotopenpraxis 26, 1990, 3, p.107-108.

Selon ces auteurs, les meilleurs résultats sont obtenus avec le complexe nitruro bis(N,N-di-n-butyl-dithiocarbamato)^{99m}Tc. Ce complexe est obtenu par une réaction d'échange de ligands à partir
15 de $TcNCl_4^-$, comme produit de départ, ce qui constitue un inconvénient car cette fabrication ne peut être effectuée facilement.

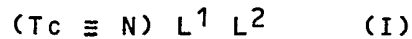
Le document WO 92/10214 décrit aussi l'utilisation de complexes de technétium comprenant
20 des ligands dithiocarbamate pour le marquage radioactif de cellules sanguines. Selon ce document, le complexe est obtenu en ajoutant un pertechnétate de technétium ^{99m} à un agent réducteur métallique, un ligand ne contenant pas le motif $\begin{matrix} >N-N< \end{matrix}$ et un
25 dithiocarbamate. Les complexes obtenus par cette technique ne sont donc pas des complexes nitruro de technétium.

La présente invention a précisément pour objet l'utilisation pour le marquage cellulaire
30 de complexes spécifiques du type nitruro bis(dithiocarbamato) Tc-^{99m}, qui peuvent être obtenus par un procédé simple et conduisent à un taux de marquage et à une stabilité élevés.

Aussi, l'invention a pour objet un procédé
35

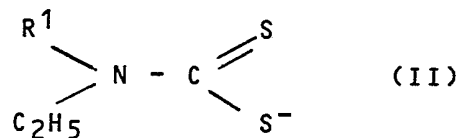
de marquage radioactif de cellules, qui consiste à ajouter à une suspension de ces cellules, un produit radiopharmaceutique comprenant un complexe de technétium 99m de formule :

5



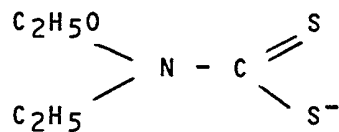
dans laquelle L^1 et L^2 qui peuvent être identiques ou différents, répondent à la formule :

10



dans laquelle R^1 est le groupe éthyle ou le groupe éthoxy, à condition que l'un au moins des L^1 et L^2 réponde à la formule :

15



20

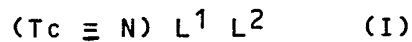
Dans ce procédé, l'utilisation d'un complexe comportant au moins un ligand N-éthyl, N-éthoxydithiocarbamate, permet d'obtenir une efficacité de marquage élevée des cellules du sang telles que les leucocytes, en particulier les granulocytes, avec une bonne sélectivité vis-à-vis d'autres cellules comme les hématies et une sélectivité encore plus élevée vis-à-vis des plaquettes.

30

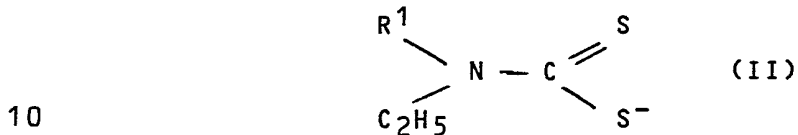
Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, le procédé de marquage radioactif de cellules consiste à ajouter à une suspension de ces cellules un produit radiopharmaceutique

35

comprenant un complexe de technétium 99m de formule :



5 dans laquelle L^1 et L^2 qui peuvent être identiques ou différents, répondent à la formule :



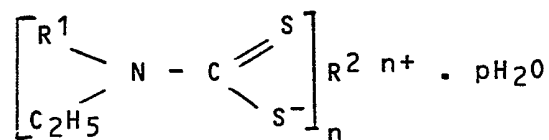
dans laquelle R^1 est le groupe éthyle ou le groupe éthoxy, ce produit radiopharmaceutique étant obtenu par un procédé comprenant

- 15 1) la réaction d'un composé oxygéné de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ avec
- a) un premier ligand azoté constitué soit par un azoture d'ammonium ou d'un métal pharmaceutiquement acceptable, soit par un composé azoté
- 20 comportant un motif >N-N< dans lequel les N sont reliés à des atomes d'hydrogène et/ou à des groupements organiques monovalents par l'intermédiaire d'un atome de carbone,
- 25 ou dans lequel l'un des N est relié à l'atome de carbone d'un groupement organique bivalent par l'intermédiaire d'une double liaison et l'autre N est relié à des atomes d'hydrogène
- 30 et/ou à des groupements organiques monovalents par l'intermédiaire d'un atome de carbone, et
- b) un agent réducteur constitué, soit par du dithionite d'ammonium ou d'un
- 35

métal pharmaceutiquement acceptable, soit par de l'étain (II) présent sous forme ionique dans la solution, soit par une phosphine ou polyphosphine, aliphatique ou aromatique, substituée ou non substituée ; et

2) la réaction du produit intermédiaire obtenu dans la première étape avec au moins un composé de formule :

10

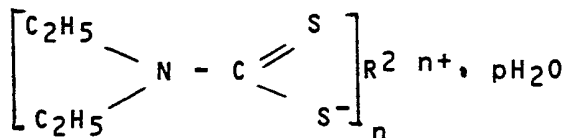


15 dans laquelle R^1 représente le groupe éthyle ou le groupe éthoxy, R^2 est un ion de métal pharmaceutiquement acceptable de valence n , H^+ avec $n=1$, ou NH_4^+ avec $n=1$, et p est égal à 0 ou est un nombre allant de 1 à 5.

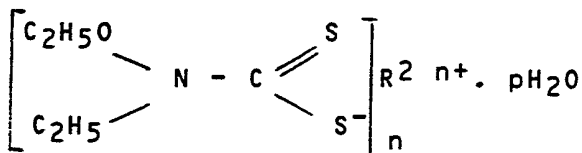
20 Généralement, R^2 représente un ion de métal alcalin ou de métal alcalino-terreux, par exemple le sodium.

De préférence, dans la deuxième étape de ce procédé, on utilise un composé de formules :

25



30



35

dans lesquelles R^2 , n et p ont les significations données ci-dessus.

Les ligands azotés, et les agents réducteurs utilisables pour la préparation de ce produit radiopharmaceutique sont ceux décrits en particulier
5 dans les documents WO 90/08657, WO 90/ 06137 et FR-A- 2 664 166.

Selon l'invention, on peut utiliser par exemple un ligand azoté constitué par le S-méthyl, N-méthyl
10 N-méthyl dithiocarbazate avec un agent réducteur constitué par la triphénylphosphine trisulfonée, un ligand azoté constitué par du S-méthyl, N-méthyl dithiocarbazate avec un agent réducteur constitué par du chlorure stanneux dihydraté introduit avec
15 de l'acide propane-1,2-diamino-N,N,N',N'-tétracétique, ou encore un ligand azoté constitué par le succinyldihydrazide avec un agent réducteur constitué par du chlorure stanneux dihydraté introduit également avec de l'acide propane-1,2-diamino-N,N,N',N'-
20 tétracétique.

Les modes de préparation des produits radiopharmaceutiques utilisés dans l'invention à partir de différents ligands azotés et de divers agents réducteurs sont décrits également dans les
25 documents WO 90/08657, WO 90/06137 et FR-A-2 664 166.

Le procédé de l'invention peut être utilisé pour le marquage de nombreux types de cellules, et plus particulièrement pour le marquage des cellules
30 du sang telles que les leucocytes et plus particulièrement les granulocytes.

Dans ce cas, la suspension de cellules utilisée peut être constituée par un échantillon

de sang total ou par des leucocytes ou granulocytes
séparés du sang et remis en suspension dans un
milieu approprié, par exemple le milieu de culture
RPMI ou un plasma pauvre en cellules. Dans ce dernier
5 cas, la concentration en granulocytes ou leucocytes
de la suspension est avantageusement de $2 \cdot 10^7$ à
 10^8 cellules par 2 à 6ml de suspension.

Pour réaliser la séparation des leucocytes
ou des granulocytes du sang, on utilise des techni-
10 ques classiques, par exemple la méthode de sédimenta-
tion et flottation sur Ficoll.

Pour mettre en oeuvre le procédé de
l'invention, on ajoute à la suspension de cellules,
par exemple à la suspension de leucocytes (ou
15 granulocytes) ou à l'échantillon de sang total,
le produit radiopharmaceutique fraîchement préparé
qui contient le complexe neutre de nitrure bis
(dithiocarbamate) technétium-99m, puis on laisse
incuber pendant une durée appropriée, par exemple
20 de 5 à 15min, en opérant sous agitation lente à
la température ambiante.

De préférence, la quantité de produit
radiopharmaceutique utilisée est telle que la
radioactivité ajoutée soit de 50 à 300MBq pour
25 $3 \cdot 10^7$ cellules. En effet, l'efficacité de marquage
décroit lorsque l'activité est supérieure à 400MBq
pour $3 \cdot 10^7$ cellules. Par ailleurs, la viabilité
des cellules est conservée entre 50 et 300MBq alors
qu'elle est réduite lorsque la radioactivité ajoutée
30 dépasse 300MBq pour $3 \cdot 10^7$ cellules.

Le produit radiopharmaceutique ajouté
a de préférence un pH ne dépassant pas 8,5 car
au-delà de cette valeur, l'efficacité du marquage
diminue.

35

Après incubation, on utilise la suspension pour effectuer des tests de diagnostic.

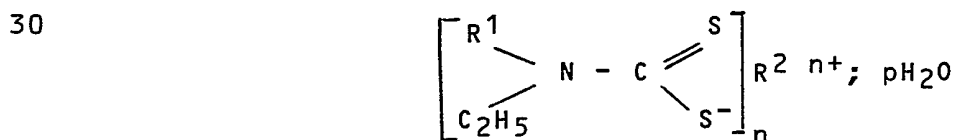
Aussi, l'invention a également pour objet une trousse pour le marquage radioactif de cellules,
5 destinée à ces tests de diagnostic.

Selon l'invention, cette trousse de marquage comprend

- un premier flacon contenant un ligand azoté constitué soit par un azoture d'ammonium
10 ou d'un métal pharmaceutiquement acceptable, soit par un composé azoté comportant un motif $\begin{array}{c} \diagup \\ \text{N-N} \\ \diagdown \end{array}$ dans lequel les N sont reliés à des atomes d'hydrogène et/ou à des groupements organiques monovalents par l'intermédiaire d'un atome de carbone, ou dans
15 lequel l'un des N est relié à l'atome de carbone d'un groupement organique bivalent par l'intermédiaire d'une double liaison et l'autre N est relié à des atomes d'hydrogène et/ou à des groupements organiques monovalents par l'intermédiaire d'un
20 atome de carbone ;

- un deuxième flacon comprenant un agent réducteur constitué, soit du dithionite d'ammonium ou d'un métal pharmaceutiquement acceptable, soit par de l'étain (II) présent sous forme ionique,
25 soit par une phosphine ou polyphosphine, aliphatique ou aromatique, substituée ou non substituée ; et

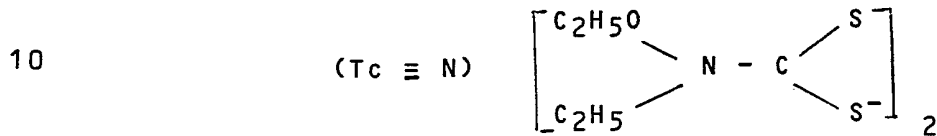
- un troisième flacon comprenant un dithiocarbamate de formule :



35 dans laquelle R^1 représente le groupe éthyle ou

le groupe éthoxy, R^2 est un ion de métal pharmaceutiquement acceptable de valence n ou H^+ avec $n=1$, ou NH_4^+ avec $n=1$, et p est égal à 0 ou est un nombre allant de 1 à 5.

5 L'invention a encore pour objet une composition radiopharmaceutique constituée par une suspension de cellules marquées par un complexe de $99m\text{-Tc}$ de formule :

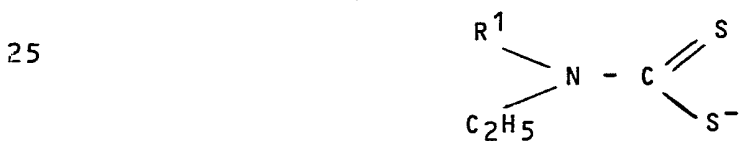


De préférence, dans cette composition, les cellules sont des leucocytes.

15 L'invention concerne également une composition radiopharmaceutique constituée par une suspension de granulocytes marqués par un complexe de $99m\text{-Tc}$ de formule :



dans laquelle L^1 et L^2 qui peuvent être identiques ou différents, répondent à la formule :



30 dans laquelle R^1 est le groupe éthyle ou le groupe éthoxy.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront mieux à la lecture des exemples suivants donnés bien entendu à titre illustratif et non limitatif.

Exemple 1 : Préparation du complexe nitruro bis(N-éthoxy N-éthyl dithiocarbamate) technétium (^{99m}Tc) (TcN-NOET).

a) Préparation du produit intermédiaire.

5 Dans un flacon type pénicilline, on introduit 0,5ml d'une solution contenant $0,8 \cdot 10^{-2}$ mol/l (1mg/ml) de S-méthyl, N-méthyl dithiocarbamate dans l'eau, puis 0,5ml d'une solution à $2 \cdot 10^{-2}$ mol/l (10mg/ml) de triphényl phosphine trisulfonée dans
10 l'eau, et 0,1ml d'acide chlorhydrique 1N.

On ajoute ensuite 0,5 à 5ml d'une solution de pertechnétate de sodium (^{99m}Tc) ayant une activité de 37MBq à 3,7GBq (1 à 100mCi) et on effectue la réaction à 80°C pendant 30min ou à 100°C pendant
15 15min.

b) Préparation du complexe final.

Au contenu du flacon obtenu dans l'étape a), on ajoute 0,1ml d'une solution de NaOH 1N et 0,5ml d'une solution aqueuse contenant 0,1mol/l (22mg/ml) de (N-éthoxy, N-éthyl) dithiocarbamate de sodium.
20

Après 30min de réaction à la température ambiante, on obtient un produit radiopharmaceutique contenant le complexe $^{99m}\text{TcN-NOET}$.

25 Exemple 2 : Préparation du complexe $^{99m}\text{TcN-NOET}$.

a) Préparation du produit intermédiaire.

Dans un flacon type pénicilline, on introduit 0,5ml d'une solution contenant $0,8 \cdot 10^{-2}$ mol/l (1mg/ml) de S-méthyl, N-méthyl dithiocarbamate
30 dans l'eau, 0,5ml d'une solution contenant $3 \cdot 10^{-2}$ mol/l (10mg/ml) d'acide propane 1,2-diamino-N,N,N',N' tétracétique dans l'eau, 0,1ml d'une solution contenant $2,2 \cdot 10^{-3}$ mol/l (0,5mg/ml) de chlorure stanneux dihydraté dans l'acide
35

chlorhydrique 0,2 N et 1ml de tampon phosphate 0,2 M (pH7,8).

5 On ajoute ensuite 0,5 à 5ml d'une solution de pertechnétate de sodium (^{99m}Tc) ayant une activité de 37MBq à 3,7GBq (1 à 100mCi) et on effectue la réaction à 80°C pendant 30min ou à 100°C pendant 15min.

b) Préparation du complexe final.

10 Au contenu du flacon obtenu dans l'étape a), on ajoute 0,5ml d'une solution aqueuse contenant 0,1mol/l (22mg/ml) de (N-éthoxy, N-éthyl) dithiocarbamate de sodium.

15 Après 30 minutes de réaction à la température ambiante, on obtient un produit radiopharmaceutique contenant $^{99m}\text{TcN-NOET}$.

Exemple 3 : Préparation du complexe $^{99m}\text{TcN-NOET}$.

a) Préparation du produit intermédiaire.

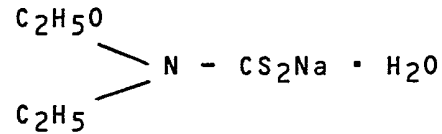
20 Dans un flacon type pénicilline, on introduit 0,5ml d'une solution contenant 0,14mol/l (20mg/ml) de succinyl dihydrazide dans l'eau, 0,5ml d'une solution contenant $3 \cdot 10^{-2}$ mol/l (10mg/ml) d'acide propane 1,2-diamino N,N,N',N' tétracétique dans l'eau, 0,1ml d'une solution contenant $2,2 \cdot 10^{-3}$ mol/l (0,5mg/ml) de chlorure stanneux dihydraté dans l'acide chlorhydrique 0,2 N et 1ml de tampon phosphate 0,2 M (pH 7,8).

25 On ajoute ensuite 0,5 à 5ml d'une solution de pertechnétate de sodium (^{99m}Tc) ayant une activité de 37 MBq à 3,7 GBq (1 à 100mCi) et on effectue la réaction à la température ambiante pendant 15min.

b) Préparation du complexe final.

30 Au contenu du flacon obtenu dans l'étape a), on ajoute 0,5ml de solution aqueuse de (N-éthoxy, N-éthyl) dithiocarbamate de sodium de formule :

35



5 Après 30 minutes de réaction à la température ambiante, on obtient un produit radiopharmaceutique contenant le complexe $^{99\text{m}}\text{TcN-NOET}$.

Exemple 4 : Préparation du complexe nitruro bis(N,N diéthylldithiocarbamate) technétium ($^{99\text{m}}\text{TcN-DEDC}$).

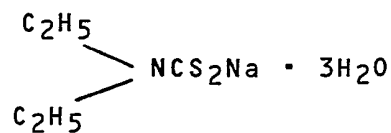
10 a) Préparation du produit intermédiaire.

On suit le même mode opératoire que dans l'exemple 1, 2 ou 3 pour préparer le produit intermédiaire en utilisant les mêmes réactifs et les mêmes conditions opératoires.

15 b) Préparation du complexe final.

Au contenu du flacon obtenu dans l'étape a), on ajoute 0,5ml d'une solution aqueuse contenant 0,1mol/l (22mg/ml) de diéthylldithiocarbamate de sodium trihydraté de formule :

20



25 On effectue la réaction pendant 60min à la température ambiante et on obtient ainsi un produit radiopharmaceutique contenant le complexe TcN-DEDC .

30 Exemple comparatif 1 : Préparation du complexe nitruro-bis(N-éthyl, N-(2-méthoxyéthyl) dithiocarbamate) $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (TcN-EMEC).

On suit le même mode opératoire que dans l'exemple 4, sauf que l'on utilise dans la deuxième

35

des granulocytes après les avoir séparés d'un échantillon de sang humain d'un volontaire sain.

On prélève 50ml de sang sur de l'acide citrique dextrose (ACD) et on les laisse sédimenter par simple effet de la gravité après addition de 10 à 15ml HAES.

On dépose ensuite le surnageant, c'est-à-dire le plasma riche en cellules, sur du Lymphoprep et on le centrifuge à 200g pendant 10min. On obtient ainsi environ $9 \cdot 10^7$ cellules.

On réalise le marquage sur $2 \cdot 10^7$ cellules en préparant une suspension de ces cellules dans 3 à 6ml de milieu RPMI et on y ajoute le produit radiopharmaceutique préparé dans l'exemple 1, puis on laisse 10 à 15min sous agitation lente à la température ambiante.

On sépare ensuite les cellules par centrifugation à 150g, on détermine leur activité puis on les lave 2h après avec une solution de RPMI et on détermine le pourcentage d'activité relarguée par les cellules.

On effectue des tests de viabilité (chimio-tactisme et chimioluminescence) sur les cellules marquées.

Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau 1 annexé.

Sur un autre lot de $2 \cdot 10^7$ cellules obtenues à partir du même échantillon de sang, on réalise un marquage avec le produit radiopharmaceutique de l'exemple 4, en utilisant également $2 \cdot 10^7$ cellules.

En fin d'opération, on détermine également le pourcentage d'activité incorporé dans les cellules, le pourcentage d'activité relarguée deux

heures après le marquage ainsi que la viabilité.

Exemples 6 à 8 : Marquage de granulocytes.

5 Dans ces exemples, on suit le même mode opératoire que dans l'exemple 5 pour marquer à partir d'un même échantillon de sang humain des granulocytes, soit par le produit radiopharmaceutique de l'exemple 1, soit par les produits radiopharmaceutiques obtenus dans les exemples comparatifs 1, 2, et 3.

10 Les quantités de cellules utilisées dans chaque essai ainsi que les résultats obtenus sont donnés dans le tableau 1.

15 Dans ce tableau, on a indiqué également les résultats donnés dans les publications pour le produit radiopharmaceutique Tc-HMPAO de l'art antérieur.

20 Au vu du tableau 1, on remarque que les deux produits radiopharmaceutiques de l'invention donnent de très bons résultats puisque le pourcentage d'activité incorporée dans les cellules varie de 85 à 94% et que l'activité relarguée 2h après le marquage est très faible.

25 En revanche, lorsqu'on utilise les produits radiopharmaceutiques des exemples comparatifs 1 à 3, les résultats sont très inférieurs, notamment dans le cas de l'exemple comparatif 2 où le pourcentage d'activité incorporée n'est que de 17%, alors que selon la publication Isotopenpraxis 26 (1990), 3, p. 107-108, ce devrait être le meilleur complexe.

30 Les produits radiopharmaceutiques de l'invention donnent également de meilleurs résultats que le Tc-HMPAO. De plus, on peut noter que le marquage des cellules avec le complexe Tc-HMPAO nécessite une quantité 10 fois plus grande de cellules.
35

Exemple 9 : Marquage de leucocytes dans le sang total.

Dans cet exemple, on prélève 25 à 30ml de sang total et on y ajoute le produit radiopharmaceutique obtenu dans l'exemple 2, en quantité telle qu'on ait une activité de 185 à 370MBq (5 à 10mCi). Après 10min d'incubation, on centrifuge l'échantillon de sang pendant 10min à 400g, puis on lave le culot cellulaire avec une solution RPMI et on centrifuge à nouveau. On sépare ensuite les cellules sur Polymorphprep et on détermine la radioactivité incorporée dans les différentes fractions cellulaires correspondant aux leucocytes et aux hématies.

Les résultats sont reportés dans le tableau 2.

Sur 4 à 5ml d'un échantillon de sang total de même origine que celui utilisé précédemment, on réalise le marquage au moyen du produit radiopharmaceutique de l'exemple 4 en utilisant la même activité et les mêmes durées d'incubation, puis on sépare les cellules comme précédemment et on détermine le pourcentage d'activité incorporée dans le culot cellulaire et le pourcentage d'activité incorporée dans les leucocytes et les hématies.

Les résultats sont également donnés dans le tableau 2.

Exemples 10 à 12 : Marquage des leucocytes dans le sang total.

On suit le même mode opératoire que dans l'exemple 9 pour réaliser un marquage du sang total dans les mêmes conditions au moyen du produit radiopharmaceutique obtenu dans l'exemple 2 et de l'un des produits radiopharmaceutiques obtenus dans

Les exemples comparatifs 1 à 3.

Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau 2.

5 Au vu de ces résultats, on remarque que les produits radiopharmaceutiques de l'invention manifestent des propriétés de marquage des leucocytes supérieures à celles des produits radiopharmaceutiques des exemples comparatifs 1 à 3 concernant des complexes analogues.

10 Ainsi, le choix conformément à l'invention des complexes TcN-NOET et TcN-DEDC permet d'atteindre de meilleurs résultats.

15

20

25

30

35

TABLEAU 1

Ex.	Produit	Nombre de cellules	% activité incorporée dans les cellules	% activité relarguée 2h après marquage	Viabilité chimiotactisme phagocytose	Coloration bleu tripan (%cellules mortes)
5	Ex 1 TcN-NOET	2,2x10 ⁷	85	6,2	oui	< 1
	Ex 4 TcN-DEDT	2,2x10 ⁷	88	4,5	oui	< 1
6	Ex 1 TcN-NOET	2,3x10 ⁷	91	2,5	oui	2
	Ex comparatif 1 TcN-EMEC	2,3x10 ⁷	45	35	oui	15
7	Ex 1 TcN-NOET	2,2x10 ⁷	94	5	oui	< 1
	Ex comparatif 2 TcN-DBDC	2,2x10 ⁷	17	12	oui	1
8	Ex comparatif 3 TcN-PDC	3x10 ⁷	53	26	oui	30
	Ex 1 - TcN-NOET	3x10 ⁷	93	3	oui	1
	Tc-HMPAO	20x10 ⁷ 23x10 ⁷	55±13 2) 44±13 1) 41-79 3)	18 1) 10 3) 15 3)	oui	

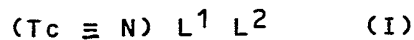
- 1) Becker W et al dans Nucl. Med. Comm. 9, 435-447, 1988,
 2) Danpure H.J. et al dans Nucl. Med. Comm. 9, 465-475, 1988,
 3) Kelbaek H. et al Eur. J. Nucl. Med. (1988), 14, 621-623

TABLEAU 2

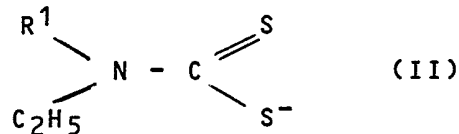
Ex.	Produit	% activité incorporée dans le culot cellulaire	% activité après séparation	
			G.B. = leucocytes	G.R. = hématies
9	Ex 2 - TcN-NOET	49	70	20
	Ex 4 - TcN - DEDC	60	29	51
10	Ex 2 - TcN-NOET	30	42	33
	Ex comparatif 1 TcN-EMEC	21	20	40
11	Ex 2 - TcN-NOET	30	43	31
	Ex comparatif 2 TcN-DBDC	19	29	24
12	Ex 2 - TcN-NOET	26	40	36
	Ex comparatif 3 TcN-PDC	13	15	39

REVENDEICATIONS

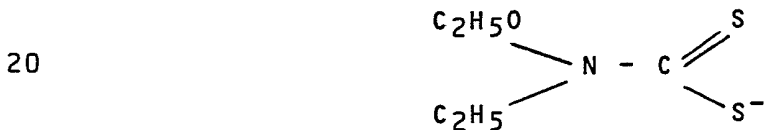
1. Procédé de marquage radioactif de
cellules, caractérisé en ce qu'il consiste à ajouter
à une suspension de ces cellules un produit
radiopharmaceutique comprenant un complexe de
5 technétium 99m de formule :



10 dans laquelle L^1 et L^2 qui peuvent être identiques
ou différents, répondent à la formule :

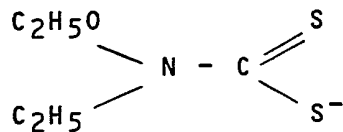


15 dans laquelle R^1 est le groupe éthyle ou le groupe
éthoxy, à condition que l'un au moins des L^1 et
 L^2 réponde à la formule :



2. Procédé selon la revendication 1,
caractérisé en ce que L^1 et L^2 représentent

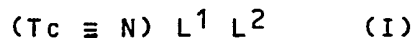
25



30 3. Procédé de marquage radioactif de
cellules, caractérisé en ce qu'il consiste à ajouter
à une suspension de ces cellules un produit

35

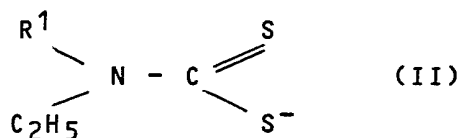
radiopharmaceutique comprenant un complexe de technétium 99m de formule :



5

dans laquelle L^1 et L^2 qui peuvent être identiques ou différents, répondent à la formule :

10



dans laquelle R^1 est le groupe éthyle ou le groupe éthoxy, le produit radiopharmaceutique étant obtenu par un procédé comprenant

15

1) la réaction d'un composé oxygéné de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ avec

20

a) un premier ligand azoté constitué soit par un azoture d'ammonium ou d'un métal pharmaceutiquement acceptable, soit par un composé azoté comportant un motif >N-N< dans lequel les N sont reliés à des atomes d'hydrogène et/ou à des groupements organiques monovalents par l'intermédiaire d'un atome de carbone, ou dans lequel l'un des N est relié à l'atome de carbone d'un groupement organique bivalent par l'intermédiaire d'une double liaison et l'autre N est relié à des atomes d'hydrogène et/ou à des groupements organiques monovalents par l'intermédiaire d'un atome de carbone, et

25

30

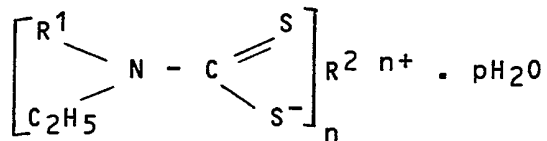
b) un agent réducteur constitué, soit par du dithionite d'ammonium ou d'un métal pharmaceutiquement acceptable, soit par de l'étain (II) présent sous forme ionique dans la solution, soit par une phosphine ou polyphosphine, aliphatique ou aromatique, substituée ou non substituée ;

- 35

et

2) la réaction du produit intermédiaire obtenu dans la première étape avec au moins un composé de formule :

5



10 dans laquelle R^1 représente le groupe éthyle ou le groupe éthoxy, R^2 est un ion de métal pharmaceutiquement acceptable de valence n , H^+ avec $n=1$, ou NH_4^+ avec $n=1$, et p est égal à 0 ou est un nombre allant de 1 à 5.

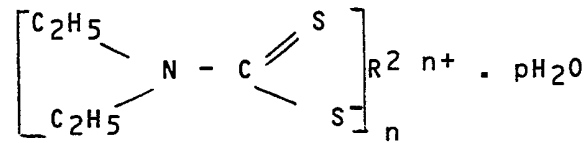
15 4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que le ligand azoté est le S-méthyl, N-méthyl dithiocarbazate, et l'agent réducteur est la triphénylphosphine trisulfonée.

20 5. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que le ligand azoté est le S-méthyl, N-méthyl dithiocarbazate, et l'agent réducteur est le chlorure stanneux dihydraté introduit avec de l'acide propane-1,2-diamino-N,N,N',N'-tétracétique.

25 6. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que le ligand azoté est le succinyl dihydrazide, et l'agent réducteur est le chlorure stanneux dihydraté introduit avec de l'acide propane-1,2-diamino-N,N,N',N'-tétracétique.

30 7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 3 à 6, caractérisé en ce que dans la deuxième étape, on utilise un composé de formule :

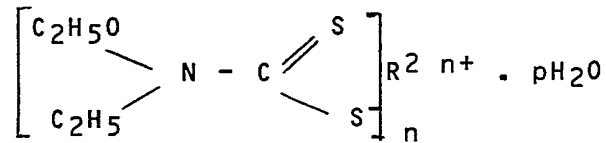
35



5 dans laquelle R^2 , n et p ont les significations données dans la revendication 3.

8. Procédé selon l'une quelconque des revendications 3 à 6, caractérisé en ce que dans la deuxième étape, on utilise un composé de formule :

10



15 dans laquelle R^2 , n et p ont les significations données dans la revendication 3.

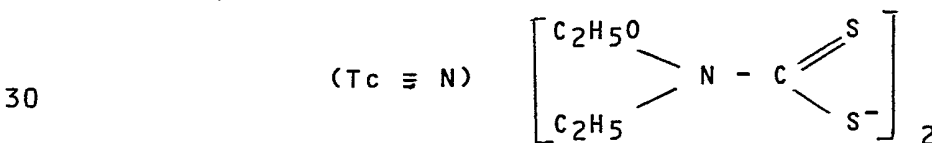
9. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que la suspension de cellules est une suspension de leucocytes ou de granulocytes.

20

10. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que la suspension de cellules est un échantillon de sang total.

25

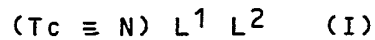
11. Composition radiopharmaceutique constituée par une suspension de cellules marquées par un complexe de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ de formule :



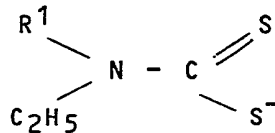
12. Composition selon la revendication

11, caractérisée en ce que les cellules sont des leucocytes.

13. Composition radiopharmaceutique constituée par une suspension de granulocytes marqués
5 par un complexe de ^{99m}Tc de formule :



10 dans laquelle L^1 et L^2 qui peuvent être identiques ou différents, répondent à la formule :



15

dans laquelle R^1 est le groupe éthyle ou le groupe éthoxy.

14. Trousse pour le marquage radioactif de cellules, caractérisée en ce qu'elle comprend

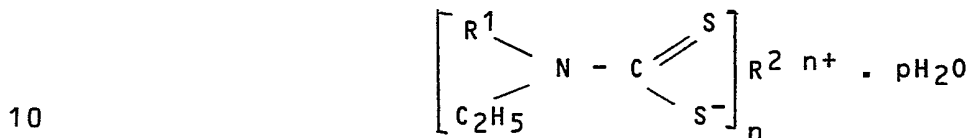
20 - un premier flacon contenant un ligand azoté constitué soit par un azoture d'ammonium ou d'un métal pharmaceutiquement acceptable, soit par un composé azoté comportant un motif $\text{N}-\text{N}$ dans lequel les N sont reliés à des atomes d'hydrogène et/ou à des groupements organiques monovalents
25 par l'intermédiaire d'un atome de carbone, ou dans lequel l'un des N est relié à l'atome de carbone d'un groupement organique bivalent par l'intermédiaire d'une double liaison et l'autre N est relié
30 à des atomes d'hydrogène et/ou à des groupements organiques monovalents par l'intermédiaire d'un atome de carbone ;

- un deuxième flacon comprenant un agent réducteur constitué, soit du dithionite d'ammonium

35

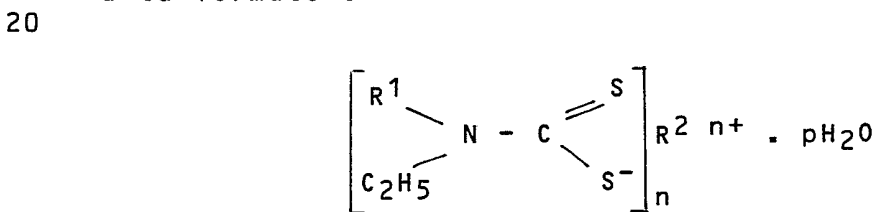
ou d'un métal pharmaceutiquement acceptable, soit par de l'étain (II) présent sous forme ionique, soit par une phosphine ou polyphosphine, aliphatique ou aromatique, substituée ou non substituée ; et

5 - un troisième flacon comprenant un dithiocarbamate de formule :



dans laquelle R^1 représente le groupe éthyle ou le groupe éthoxy, R^2 est un ion de métal pharmaceutiquement acceptable de valence n ou H^+ avec $n=1$,
15 ou NH_4^+ avec $n=1$, et p est égal à 0 ou est un nombre allant de 1 à 5.

15. Trousse selon la revendication 14, caractérisée en ce que le dithiocarbamate répond à la formule :



25

avec R^2 , n et p ayant la signification donnée dans la revendication 14.

30

35

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FR 9213963

FA 479597

Page 1

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X,Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 114, no. 19 Columbus, Ohio, US; abstract no. 181436n, * abrégé * & DD-A-279 549 (AKADEMIE DER WISSCHENSCHAFTEN DER DDR) 6 Juin 1990 ---	1-15
D,Y	WO-A-9 006 137 (COMPAGNIE ORIS INDUSTRIE S. A.) 14 Juin 1990 * page 2, ligne 20 - page 5, ligne 9; revendications * ---	1-15
D,Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 112, no. 25 Columbus, Ohio, US; abstract no. 231908z, * abrégé * & ISOTOPENPRAXIS vol. 26, no. 3, 1990, pages 107 - 108 S. ABRAM ET AL. 'BLOOD CELL LABELLING EXPERIMENTS WITH LIPOPHILIC TECHNETIUM COMPLEXES' ---	1-15
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 107, no. 11 Columbus, Ohio, US; abstract no. 92985d, * abrégé * & J. RADIOANAL. NUCL. CHEM. vol. 102, no. 2, 1986, pages 309 - 320 ABRAM S. ET AL 'LIPOPHILIC TECHNETIUM COMPLEXES. IV. NEUTRAL, LIPID-SOLUBLE TECHNETIUM COMPLEXES WITH DITHIOLIGANDS CONTAINING TC:O AND TC.TPLBOND. N CORES. AN IN VITRO STUDY.' --- -/--	1-15
		A61K
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
13 AOUT 1993		BERTE M.J.
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		

2

EPO FORM 1503 03.82 (P0413)

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

FR 9213963
FA 479597
Page 2

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 109, no. 11 Columbus, Ohio, US; abstract no. 88903z, * abrégé * & NUCL. MED. BIOL. vol. 15, no. 4, 1988, pages 451 - 457 J. BALDAS ET AL. '99MTC-NITRIDO RADIOPHARMACEUTICALS BASED ON NITROGEN HETEROCYCLIC LIGANDS CONTAINING A THIOL GROUP.'	1-15
D,A	WO-A-9 210 214 (MALLINCKRODT MEDICAL INC.) 25 Juin 1992 * revendications *	1-15
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 106, no. 13 Columbus, Ohio, US; abstract no. 98660v, * abrégé * & J. RADIOANAL. NUCL. CHEM. vol. 105, no. 5, 1986, pages 267 - 276 J. BALDAS ET AL. 'THE TECHNETIUM-99M-NITRIDO COMPLEX OF TROPOLONE: A HIGHLY LIPOPHILIC BLOOD LABELING AGENT.'	1-15
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
13 AOUT 1993		BERTE M.J.
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		

2

EPO FORM 1503 03.82 (P0413)