

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 386 849**

51 Int. Cl.:

A61K 51/06 (2006.01)

A61K 51/12 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 103/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08775355 .4**

96 Fecha de presentación: **25.07.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2175888**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.04.2010**

54 Título: **Composiciones radiofarmacéuticas que comprenden polisacáridos injertados por poliaminas**

30 Prioridad:
26.07.2007 FR 0756750
26.07.2007 US 952094 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.09.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.09.2012

73 Titular/es:
LABORATOIRES CYCLOPHARMA
BIOPOLE CLERMONT LIMAGNE
63360 SAINT BEAUZIRE, FR

72 Inventor/es:
DENIZOT, Benoît;
LACOEUILLE, Franck;
LE JEUNE, Jean Jacques y
HINDRE, François

74 Agente/Representante:
Curell Aguilá, Mireia

ES 2 386 849 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones radiofarmacéuticas que comprenden polisacáridos injertados por poliaminas.

5 La invención se refiere a nuevas composiciones farmacéuticas basadas en polisacáridos injertados y a su utilización en la imagenología médica, específicamente en la gammagrafía y en la radioterapia interna.

10 Las partículas vectoras de elementos radioactivos se han utilizado durante mucho tiempo en los campos médicos y biológicos (para una visión general, véase Häfeli, 2001), por ejemplo, para estimar el flujo sanguíneo tisular mediante partículas no reabsorbibles de un tamaño suficiente (varias decenas de micrómetros) que son captadas en la primera red capilar encontrada una vez se inyectaron en la red vascular. Aunque dichas partículas pueden utilizarse, por ejemplo, en forma de partículas de vidrio (Häfeli *et al.*, 1999) para exponer tejidos específicos (en particular tejidos tumorales) a la radiación ionizante, el hecho de que no son reabsorbibles significa que no es posible desarrollar aplicaciones rutinarias *in vivo*, por tanto a un nivel diagnóstico, y también frecuentemente a un nivel terapéutico (cuando no es deseable la isquemia total del tejido diana).

15 La utilización más habitual *in vivo* de las micropartículas en el hombre es para el diagnóstico gammagráfico de un embolismo pulmonar. Esta patología habitual (aproximadamente 650.000 nuevos casos anuales en USA) es causada por trombos sanguíneos, muy frecuentemente de las extremidades inferiores, que se desplazan a través del sistema venoso, pasan a través del corazón derecho y bloquean los capilares pulmonares. Si el embolismo es masivo, existe un riesgo de insuficiencia de la bomba cardíaca. Para ser efectivo y evitar embolismos masivos, es necesario detectar pequeños embolismos de forma temprana para implementar un régimen extendido de tratamiento anticoagulante. La tomografía computarizada espiral de rayos X (escáner de rayos X) es un procedimiento que se ha extendido ampliamente en los años recientes, pero su capacidad ejecutiva en términos de embolismos periféricos es escasa. Además, la dosis de radiación ionizante a la cual se expone el pecho puede provocar cáncer mamario. Por tanto, la gammagrafía de perfusión conserva habitualmente su lugar, evaluándose la ventilación mediante aerosol o mediante gases radiactivos.

20 Históricamente uno de los primeros usos de las partículas que se conocía que eran reabsorbibles fue la gammagrafía de perfusión pulmonar utilizando partículas de óxido de hierro marcadas con ^{99m}Tc (patentes US nº 3.962.412 y US nº 4.057.616). Este procedimiento, que utilizó iones de Fe^{2+} , permitió una reducción en el pertechnetato y un buen nivel de unión sobre los óxidos de hierro y los hidróxidos, que formaban el núcleo de las partículas, que debía alcanzarse. Sin embargo, uno de los límites de este tipo de tecnología fue la dificultad de obtener un tamaño homogéneo de aproximadamente varias decenas de micrómetros. Además, el proceso para liofilizar dichas preparaciones que iban a utilizarse en forma del kit de marcado, fue también delicado.

25 Una alternativa a la utilización de dichas partículas es utilizar proteiones como matrices de partículas (patente US nº 3.663.685), en particular la albúmina de huevo o la albúmina sérica (patente US nº 4.024.233). Existen procedimientos para obtener tamaños homogéneos (por ejemplo patente US nº 6.709.650), a menudo un nivel relativamente alto de complejidad en términos de producción, que da lugar a un nivel significativo de variabilidad entre los distintos lotes. Además, el marcado utilizando yodo y tecnecio es un procedimiento relativamente sencillo (patente US nº 4.410.507 por ejemplo). Estos productos son habitualmente muy utilizados, para diagnosticar un embolismo pulmonar en la práctica clínica. Sin embargo estas partículas tienen tres limitaciones significativas para su uso en el hombre, en particular en la gammagrafía de perfusión pulmonar después de inyección intravenosa:

- 30
- 35 - La cinética de degradación *in situ* dura de modo frecuente, relativamente largos períodos de tiempo de más de cuatro horas. Esta duración es menos apropiada que un período de tiempo más corto (de una a dos horas), en términos del tratamiento intravenoso con fibrinolíticos, permitiendo un diagnóstico precoz y la efectividad de monitorizarse subsiguientemente, directamente después del tratamiento;
 - 40 - Estas partículas pueden ser inmunógenos, y esta es la razón por la que se utilizan preferentemente las proteínas de origen humano;
 - 45 - Si estas partículas son de origen animal o humano, todas estas formulaciones implican potencialmente el riesgo de transmitir contagios, en particular, contagios víricos (VIH, hepatitis) y priones (agentes transmisores no convencionales que son responsables de la enfermedad de Creutzfeld-Jacob, etc.), siendo esta transmisión muy difícil de prevenir habitualmente. Un procedimiento para aumentar la seguridad consiste en preparar solamente las partículas con soluciones de albúmina que se hayan guardado durante seis meses. Además de los costes adicionales implicados, esta precaución no es totalmente fiable ya que uno de los donadores de sangre puede estar sometido a la positización de cualquier prueba previamente negativa, o puede declarar subsiguientemente la enfermedad y, por, tanto, encontrarse que es un portador (y potencialmente un contaminante) después de una fase silente de incubación de varios años (en el caso de agentes transmisores no convencionales).

50

55

60

65 Ciertos equipos han propuesto la utilización de liposomas, que presentan la ventaja específica de no ser tóxicos. Sin embargo, es extremadamente difícil producir liposomas de gran tamaño (varias decenas de micrómetros) que sean

estables durante la liofilización y reconstitución. Además, existen tres amplios procedimientos para marcar liposomas: incorporar el producto radioactivo en el interior de la vesícula (durante la preparación o con un producto lipofílico que se convierta en hidrofílico en el interior, tal como l'HMPAO-^{99m}Tc), utilizando el núcleo alifático de la bicapa lipídica como un sistema de retención de un producto hidrofóbico (tal como ¹¹¹In-oxina), o agentes

5
acomplejantes de injerto superficial, como en el caso de l'HYNIC-^{99m}Tc. En todos los casos anteriores, es difícil alcanzar un buen grado de marcado, debido a la inestabilidad de los liposomas.

Para remediar estas limitaciones se propuso que se utilizarían polímeros biodegradables completamente sintéticos (ES 2096521, Delgado A. *et al.*, 2000). Sin embargo, en opinión, incluso de los mismos autores, la utilización de poliésteres representa una dificultad para obtener un marcado estable y un buen nivel de reproducibilidad para la liofilización y la cinética de liberación.

10

Una forma complementaria para obtener polímeros y partículas beneficiosos es utilizar polisacáridos naturales o artificiales (patentes US nº 3.663.685, US nº 3.758.678). Los orígenes vegetales o microbiológicos de algunos de dichos polisacáridos, aseguran que puede no existir transmisión de patógenos que se origina en el reino animal. Además de la facilidad con la que pueden obtenerse y del bajo coste (de varios de ellos), su rica química permite que el proceso de biodegradación pueda ser bien controlado.

15

La solicitud de patente FR 2273516 divulga la utilización de perlas microportadoras de amilopectina que se entrecruzan mediante la epíclorohidrina y están marcadas con ^{99m}Tc para la gammagrafía de perfusión pulmonar. Sin embargo los grupos hidroxilos de la amilopectina forman uniones débiles con el tecnecio y no permiten que se obtenga el marcado estable. Además, se sabe que la epíclorohidrina, que se utilizó para el entrecruzamiento, es mutagénica y muy tóxica.

20

Las partículas de almidón injertadas por elementos radioactivos mediante sistemas de acomplejamiento amínico, que incluyen, por lo menos, un átomo de azufre, también se han dado a conocer (FR 2797769). La tasa de formación de los complejos de los elementos radioactivos mediante los sistemas de acomplejamiento, parece ser relativamente satisfactoria, pero las formulaciones específicas que se han descrito, muestran una cinética de degradación muy rápida, (en menos de 10 minutos), lo cual constituye un factor limitante en términos de tomografía. La cinética de degradación parece depender, en parte, de la tasa de oxidación y de la del injerto del almidón de maíz seleccionado. Además, parecen tener una estabilidad limitada de almacenamiento. Finalmente, los grupos de acomplejamiento que se describen en este documento, son estructuras relativamente complejas que pueden requerir varios estadios en la síntesis química, lo cual puede aumentar el riesgo de toxicidad de las composiciones radiofarmacéuticas y sus costes de producción. A un nivel toxicológico, las vías metabólicas para la degradación de los compuestos estudiados no se han identificado y pueden entrañar fuentes de compuestos secundarios potencialmente peligrosos.

25
30
35

Más generalmente, los polímeros polisacáridos sobre los que los átomos radioactivos se han fijado, se utilizaron como agentes radioactivos de marcado (dextrano marcado con ^{99m}Tc), para las zonas vasculares y/o intersticiales (como una función del peso molecular del dextrano, Kellaway I.W., *et al.*, 1995), como un indicador de permeabilidad (Akgun A. *et al.*, 2005), o para la detección de la linfodenomegalia (Paiva G.R. *et al.*, 2006), como un agente que permite que la cantidad de átomos radioactivos aumente en la utilización interna de la radioterapia (dextrano yodizado con ¹³¹I, unido a las proteínas, Andersson A. *et al.*, 1992), e incluso como un agente que permite que la depuración renal del trazador radioactivos aumente, con objeto de incrementar la proporción señal-ruido, en la utilización para una vectorización activa por los péptidos o anticuerpos (dextrano marcado con ^{99m}Tc, Line B.R. *et al.*, 2000).

40
45

El documento WO 00/21571 divulga una composición que incluye el radiofarmacéutico ^{99m}Tc-lisina-dextrano. En este conjugado, ^{99m}Tc forma complejo mediante los grupos pendientes de la lisina que se unen covalentemente a la estructura del dextrano, después de aminación reductora. Este conjugado radiomarcado se describe para las imágenes tumorales. La invención se refiere a un procedimiento para preparar una composición que incluye un polisacárido que posee uno o más grupos acomplejantes obtenidos uniendo covalentemente la putrescina NH₂(CH₂)₄NH₂, la espermina H₂N(CH₂)₃NH(CH₂)₄NH(CH₂)₃NH₂, la espermidina NH₂(CH₂)₃NH(CH₂)₄NH₂ o la cadaverina NH₂(CH₂)₅NH₂, con dicho polisacárido, formando todos o algunos de dichos grupos acomplejantes un

50
55

- i) la puesta en contacto de un polisacárido con un agente oxidante controlado,
 - ii) la puesta en contacto del polisacárido oxidado con un compuesto de acomplejamiento seleccionado a partir de entre la putrescina, espermina, espermidina o cadaverina;
 - iii) opcionalmente, poner en contacto el polisacárido obtenido en punto ii) con un agente reductor; y
 - iv) poner el polisacárido obtenido en el punto ii) o iii) en contacto con una sal metálica polivalente, siendo ésta ^{99m}Tc.
- 60
65

La invención se refiere también a una composición que incluye un polisacárido que posee uno o más grupos acomplejantes obtenidos uniendo covalentemente la putrescina $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$, la espermina $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$, la espermidina $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$ o la cadaverina $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_5\text{NH}_2$, con dicho polisacárido, formando todos o algunos de dichos grupos acomplejantes un complejo con por lo menos un metal polivalente, siendo el polisacárido de origen vegetal o microbiológico, y seleccionándose de entre almidón, celulosa, amilopectina, amilosa, agarosa, quitosán, pululano o dextrano y mezclas de dos o varios de ellos, siendo capaz dicha composición de obtenerse mediante un procedimiento que incluye las etapas de:

- i) la puesta en contacto de un polisacárido con un agente oxidante controlado,
- ii) la puesta en contacto del polisacárido oxidado con un compuesto de acomplejamiento seleccionado a partir de entre la putrescina, espermina, espermidina o cadaverina;
- iii) opcionalmente, poner en contacto el polisacárido obtenido en punto ii) con un agente reductor; y
- iv) poner el polisacárido obtenido en el punto ii) o iii) en contacto con una sal metálica polivalente, siendo seleccionada ésta de entre los isótopos radioactivos de tecnecio, renio, cobre, estroncio, indio, samario, estaño, escandio, itrio, galio, gadolinio o lutecio, siendo particularmente preferido $^{99\text{m}}\text{Tc}$.

Estas composiciones son particularmente ventajosas, porque permiten una elevada tasa de acomplejamiento de dichos átomos polivalentes para obtenerlas, permitiendo que se reduzcan las dosis de composiciones radiofarmacéuticas administradas a un paciente en términos de los átomos radioactivos, la mejoría de calidad de la imagen en el procedimiento de imagenología médica, y la reducción del riesgo toxicológico.

Además, estas composiciones presentan una muy buena extracción pulmonar, no son tóxicas y las dosis utilizadas son fácilmente biodegradables mediante los conocidos procedimientos de bioeliminación, son esterilizables y pueden envasarse en forma de un estuche para diagnóstico.

El polisacárido según la invención está preferentemente en forma de, preferentemente, partículas esféricas, en particular, micro- o nanopartículas.

El tamaño de la partícula puede ser de entre 10 nm y 200 μm , preferentemente entre 10 y 100 μm , y más preferentemente aproximadamente 40 μm para aplicaciones de bloqueo capilar (tales como gammagrafía de perfusión pulmonar, por ejemplo, para el diagnóstico gammagráfico del embolismo pulmonar). Las partículas nanométricas, es decir, las que poseen un tamaño inferior a 1 μm (en particular las que tienen un tamaño de entre 10 y 500 nm, específicamente las que tienen un tamaño de aproximadamente entre 40 y 80 nm), son particularmente útiles para la administración intratisular de las composiciones según la invención, por ejemplo, para detectar la presencia de, y/o para visualizar la linfadenomegalia, para gammagrafía, para producir la imagen de la médula ósea o de los ganglios linfáticos después de la inyección intravenosa ("gammagrafía coloidal marcada"), o asimismo, para la irradiación de los tejidos mediante dichos polisacáridos en la radioterapia interna.

Las partículas micrométricas, es decir, las que muestran un tamaño de aproximadamente 1 μm y superior (hasta aproximadamente 10 μm), pueden administrarse intravenosamente y son particularmente útiles para visualizar mediante imagenología médica el sistema de fagocitos mononucleares tal como el hígado, la médula ósea o similares, para el tratamiento de tumores hepáticos o esplénicos mediante radioterapia interna.

Los polisacáridos que pueden utilizarse según la invención son, preferentemente de origen natural, en particular, de origen vegetal o microbiológico. Los ejemplos incluyen, en particular, almidón, celulosa, amilopectina, amilasa, agarosa, pulalano, quitosán o dextrano y sus derivados, así como mezclas de dos o más de ellos; se prefiere particularmente el almidón.

Ventajosamente, el polisacárido reduce los riesgos microbiológicos de las composiciones radiofarmacéuticas, en comparación con aquellos que se basan en proteínas, tales como la albúmina humana y la gelatina, generalmente, gelatina porcina. Otra ventaja es que la cinética de la degradación *in situ* puede modificarse según la tasa de oxidación o el injerto del polisacárido, siendo éste difícil de obtener de forma reproducible, con proteínas.

El almidón puede ser, por ejemplo maíz, trigo, arroz, patata o almidón de mijo, etc., o un derivado tal como hidroxietilamidona (HES) que se degrada lentamente después de una inyección intravenosa, permitiendo que pueda utilizarse como una solución que puede rellenar el vaso en caso de choque hipovolémico. Este producto no activa el complemento y por tanto, no conduce a los efectos secundarios resultantes.

Los grupos de acomplejamiento son aquellos obtenidos mediante unión covalente de la putrescina $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$, espermina $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$, espermidina $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$, o cadaverina $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_5\text{NH}_2$, con el polisacárido oxidado.

Estos grupos de acomplejamiento son particularmente ventajosos, pues se obtienen de las poliaminas bigénicas, es

decir, de las que se encuentran en un medio biológico, reduciendo esto el riesgo de toxicidad de las composiciones, a causa de que los procedimientos de degradación de estos productos son bien conocidos. Además, estas poliaminas endógenas están comercializadas a un bajo coste.

- 5 La proporción de los grupos de acomplejamiento puede ser de entre 0,1 a 200%, basándose en las unidades monosacáridas del polisacárido, preferentemente de 10 a 100%.

10 Los metales polivalentes son los isótopos radioactivos del tecnecio tal como ^{99m}Tc , ^{94}Tc o ^{94m}Tc , los del renio, tales como ^{188}Re o ^{186}Re , los del cobre, tales como ^{60}Cu , ^{61}Cu , ^{64}Cu o ^{67}Cu , los del estroncio, tales como ^{89}Sr , los del indio tales como ^{111}In o ^{113}In , los del samario tales como ^{153}Sm , los del estaño tales como ^{113m}Sn , los del escandio tal como ^{44}Sc , los del itrio tales como ^{90}Y o ^{86}Y , los del galio tales como ^{67}Ga o ^{68}Ga , los del gadolino o los del lutecio, siendo preferido particularmente el ^{99m}Tc .

15 Preferentemente las composiciones según la invención, comprenden también un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Preferentemente dicha composición contiene una cantidad efectiva de polisacárido marcado por un elemento radioactivo mediante los grupos de acomplejamiento según la invención.

- 20 Las composiciones según la invención son preferentemente farmacéuticas y/o diagnósticas.

25 Las composiciones farmacéuticas según la invención pueden presentarse en formas preparadas para la administración parenteral, intravenosa, intraarterial, intramuscular, intersticial, intracerebral, intratecal o intrapulmonar, para la administración vía el ámbito ORL, ocular, vaginal o rectal, membranas mucosas o incluso enteralmente (tránsito gástrico) y vía aerosoles.

Se presentarán por tanto en forma de solutos, soluciones o suspensiones inyectables, o en forma de polvos o viales de dosis únicas o múltiples.

- 30 Para la utilización parenteral, los vehículos más convenientes de utilización son agua, soluciones acuosas, suero fisiológico y soluciones isotónicas.

35 Las composiciones según la invención pueden prepararse aplicando o adaptando cualquier procedimiento conocido *per se* y/o por el experto en la materia, en particular los descritos por Larock en *Comprehensive Organic Transformations*, VCH Pub, 1989, o aplicando o adaptando los procedimientos que se describen en los ejemplos siguientes.

40 El procedimiento según la invención de la reivindicación 1 o para preparar la composición de la reivindicación 3, se lleva a cabo generalmente en agua, a temperatura ambiente.

Los ejemplos de agentes de oxidación controlados que pueden utilizarse incluyen, en particular, los peryodatos, por ejemplo, peryodato sódico.

45 Los ejemplos de agentes reductores incluyen, en particular, borohidruro sódico.

Sin desear vincularse a ninguna teoría en particular, la oxidación controlada del polisacárido conduce a la formación de las funciones carbonilo, que reaccionan con los grupos HN- de las aminas que se mencionan en las reivindicaciones 1 y 3.

50 Como ejemplo, el almidón, después de oxidación controlada, provoca la formación de funciones aldehído, que pueden reaccionar con los grupos H_2N de la putrescina, espermina, espermidina o cadaverina, para formar enlaces covalentes imínicos (-CH=N-), y enlaces covalentes aminos (-CH-NH-) después de la reducción.

55 Puede llevarse a cabo la etapa (iv) que consiste en poner en contacto el polisacárido obtenido con una sal metálica polivalente (reacción de marcado), y en el caso de marcado, se realiza ventajosamente con ^{99m}Tc , en presencia de agentes reductores del tipo del estaño, borato y derivados o del ácido ascórbico, o de cualesquier otros medios que reduzcan de modo efectivo la sal metálica polivalente radioactiva, en particular en el caso del tecnecio.

60 El procedimiento según la invención puede también incluir la etapa subsiguiente de aislamiento de las composiciones obtenidas.

65 Según otro objetivo, la invención se refiere a la utilización de las composiciones anteriormente definidas, en particular para la producción de una composición diagnóstica para la imagenología médica, humano o veterinaria, en particular la gammagrafía monofotónica, difotónica o, incluso, polifotónica.

Las composiciones según la invención son también particularmente útiles para visualizar uno o más órganos en un

paciente o en un animal, tales como el pulmón, hígado, bazo, médula ósea o ganglios linfáticos.

Algunas composiciones según la invención pueden también utilizarse para visualizar los ganglios centinela.

5 Según otro objetivo, las composiciones según la invención pueden utilizarse para obtener una composición farmacéutica para el tratamiento del cáncer en un paciente o en un animal mediante radioterapia interna, en particular para tratar ganglios linfáticos o tumores hepáticos o esplénicos.

10 En este contexto, las composiciones, de la invención se utilizan generalmente para exponer los tumores cancerosos, en particular hepáticos y/o del bazo, o ganglios linfáticos, a la radiación ionizante.

Tal como se ha utilizado anteriormente y haciendo referencia a la descripción total de la invención sus términos, si no se ha establecido de otro modo, deberán entenderse con los significados siguientes:

15 El término "polisacárido" se refiere a un polímero que resulta de la unión de diversas unidades de monosacáridos, en particular de 10 a 1.000 monosacáridos.

20 Según la presente invención, los radicales alquilos son radicales hidrocarburos saturados de cadena recta o ramificada, que contienen de 1 a 6 átomos de carbono, preferentemente de 1 a 4 átomos de carbono.

Los radicales lineales incluyen metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo y hexilo.

25 Los radicales isopropilo, terc-butilo, 2-etilhexilo, 2-metilbutilo, 2-metilfenilo y 1-metilfenilo pueden mencionarse en particular como radicales ramificados o radicales sustituidos por uno o más radicales alquílicos.

Los radicales alcoxilos según la presente invención son radicales de fórmula -O-alquilo, definiéndose éste tal como anteriormente en la presente memoria.

30 Los radicales alquiltio según la presente invención son radicales de fórmula -S-alquil. Siendo el alquilo tal como se ha definido anteriormente en la presente memoria.

Los radicales alquilenos son radicales hidrocarburos divalentes ramificados o lineales que contienen de 1 a 6 átomos de carbono.

35 Los radicales alquilenos son radicales hidrocarburos divalentes lineales o de cadena recta y comprenden una o varias insaturaciones etilénicas. Los radicales alquilenilénicos incluyen, en particular, los radicales -CH=CH-, -CH₂CH=CH-, -C(CH₃)=CH-, -CH₂CH=CHCH₂-.

40 Arileno hace referencia a un radical hidrocarburo aromático divalente mono o bicíclico que contienen de 6 a 10 átomos de carbono. Los radicales arilénicos incluyen, en particular, el radical fenilénico o naftilénico.

Bis-arileno hace referencia a un sistema divalente que incluye dos radicales hidrocarburo aromáticos mono- o bicíclicos que contienen de 6 a 10 átomos de carbono. Los radicales bis-arilénicos incluyen, en particular, el radical bifenilénico o el binaftilénico.

45 Figuras

Figura 1: Acoplamiento de la cadaverina a partículas de almidón visualizado con un microscopio óptico de fluorescencia en presencia de fluorescamina.

50 Figuras 2 y 3: Imágenes gammagráficas típicas de ratas (proyección anterior) que recibieron intravenosamente partículas de almidón oxidado un 20% marcados con 4 MBq de ^{99m}Tc, justamente después de inyección (figura 2) y después de 15 minutos (figura 3).

55 Figuras 4, 5, 6: Imágenes gammagráficas típicas de ratas (proyección anterior), que recibieron intravenosamente partículas de almidón oxidado al 50% unidas a cadaverina marcada con 4 MBq de ^{99m}Tc después de 15 minutos (figura 4), 30 minutos (figura 5) y 90 minutos después de la inyección (figura 6).

60 Figuras 7, 8, 9: Imágenes gammagráficas típicas de ratas (proyección anterior) que recibieron intravenosamente partículas de almidón oxidado al 50% unidas a cadaverina marcada con 4 MBq de ^{99m}Tc después de 5 minutos (figura 7), 15 minutos (figura 8) y 30 minutos después de la inyección (figura 9).

65 Figuras 10 y 11: Características morfológicas visualizadas mediante microscopio óptico (a un aumento de 10x) de micropartículas de almidón oxidado al 50% marcadas anteriormente (figura 10) y después de la reacción con cadaverina (figura 11).

Figura 12: Ejemplo de distribuciones de tamaño de micropartículas de almidón oxidado unidas a la cadaverina, medidas utilizando un contador Coulter Multisizer 3.

5 Figura 13: Estudio gráfico de los efectos de la temperatura (B1), tiempo de reacción (B2), valor equivalente del agente reductor (B3) y tiempo último de reducción (B4) sobre el porcentaje de nitrógeno contenido en las micropartículas finales.

10 Figura 14: Estudio gráfico bidimensional que modela los efectos de los 4 parámetros experimentales (valor equivalente/amina; pH de la reacción; nivel de oxidación del almidón y concentración de éste en el medio reactivo) sobre el rendimiento de la unión de la cadaverina con las micropartículas de almidón.

15 Figura 15: Imágenes típicas tomadas después de la inyección intravenosa de micropartículas de almidón marcadas con ^{99m}Tc (formulación C) en ratas Wistar macho. Las imágenes planas de (margen idéntico) se extrajeron a los 10, 20, 60 y 120 minutos de un estudio dinámico que duró 120 minutos (180-45 imágenes por segundo).

Figura 16: Ejemplo de la curva tiempo-actividad obtenida a partir de los estudios dinámicos gammagráficos llevados a cabo después de la inyección intravenosa de micropartículas de almidón marcadas con ^{99m}Tc (formulación C) en ratas Wistar macho.

20 Figura 17: Imágenes típicas tomadas después de inyección intravenosa de micropartículas de almidón marcadas con ^{99m}Tc (formulación C) en ratas Wistar macho. Las imágenes son el resultado de imaginología de rayos X, junto con una adquisición gammagráfica estática (de margen idéntico) que se llevó a cabo a los 10, 20 y 90 minutos después de la inyección (600 estáticos en segundos).

25 Figuras 18, 19 y 20: Separación mediante cromatografía de penetración de los metabolitos urinarios recuperados después de la inyección intravenosa de ratas Wistar macho con micropartículas de almidón marcadas con ^{99m}Tc (formulación C).

30 Se eluyeron distintas muestras urinarias recuperadas utilizando una columna Sephadex G15 con un límite de exclusión de 1.500 daltons (18), utilizando una columna P6 con un límite de exclusión de 5.000 daltons (19) y utilizando una Sephadex G50 con un límite de exclusión de 10.000 daltons (20).

Los materiales de partida que se utilizaron son productos que se conocen bien o se preparan según procedimientos conocidos.

35 Ejemplos

Nº 1: Partículas de almidón acopladas a una poliamina natural; verificación del acoplamiento mediante reacción con la fluorescamina

40 Oxidación controlada de las partículas de almidón:

45 Se dispersaron 10 g (correspondientes a 0,055 moles de la unidad de glucosa) del almidón de patata (almidón original de la patata según la monografía de la farmacopea europea) tamizados entre 36 y 50 μm , en 100 ml de agua. Se añadieron 0,028 moles de peryodato sódico (NaIO_4), es decir, 6 g, previamente disueltos en agua 100 ml. La suspensión se agitó durante 18 horas a temperatura ambiente. Después de este tiempo, se obtuvo una suspensión de partículas del almidón oxidado al 50%. El almidón oxidado se recuperó mediante centrifugación, enjuagándose entonces tres veces con 200 ml de agua.

50 Funcionalización del almidón oxidado mediante acoplamiento a una poliamina natural

55 Después de enjuagar, 1 g de almidón, es decir, 0,0055 moles de unidades de glucosa, se incubó en 60 ml de agua y se puso en contacto con una solución de 0,00385 moles de poliaminas naturales (putrescina, cadaverina, espermina o espermidina) en 10 ml de agua, es decir 0,0077 moles de NH_2 (1,4 eq.), durante 18 horas a temperatura ambiente. Para estabilizar la imina formada, se añadieron a la suspensión del almidón modificado, bajo agitación, durante 1 hora, 0,56 g de NaBH_4 , es decir, 0,015 moles. Las partículas se decantaron entonces, se filtraron y se lavaron tres veces con 200 ml de agua, liofilizándose entonces.

60 Verificación del acoplamiento almidón-amina mediante microscopio óptico de fluorescencia

65 El acoplamiento de la cadaverina a las partículas de almidón se verificó observando, mediante un microscopio óptico de fluorescencia, un complejo fluorescente formado durante la adición de 100 μl de una solución de 3 mg por ml de fluorescamina ($\text{C}_{17}\text{H}_{10}\text{O}_4$) a partículas de almidón funcionalizadas con cadaverina (10 mg en 300 μl de agua). La formación de este complejo fluorescente, comprobado mediante microscopio de fluorescencia, indica la presencia de funciones aminas primarias (NH_2) en las partículas de almidón funcionalizado con una reacción específica de dichas aminas sobre la clara fluorescamina, que entonces adopta un color amarillo verdoso, confirmando la eficacia del

acoplamiento almidón/oxidado amino.

Nº 2: Partículas de almidón oxidado de la patata como radiotrazador utilizado para la imaginología gammagráfica del hígado y del bazo

5

Oxidación controlada de las partículas de almidón:

Como en el ejemplo 1, 10 g (correspondientes a 0,055 moles de la unidad de glucosa) del almidón de la patata (almidón original de la patata según la monografía de la farmacopea europea) tamizados entre 36 y 50 µm, se dispersaron en 100 ml de agua. 0,0112 moles de peryodato sódico (NaIO₄), es decir, 2,4 g, se añadieron previamente disueltos en agua. La suspensión se agitó durante 18 horas a temperatura ambiente. Después de este tiempo, se obtuvo una suspensión de partículas del almidón oxidado al 20%. El almidón oxidado se recuperó mediante centrifugación, enjuagándose entonces tres veces con 200 ml de agua y liofilizándose entonces.

15 Reacción del marcado con ^{99m}Tc:

Se colocaron 20 mg de almidón liofilizado y oxidado al 20% en matraz de elución vacío bajo atmósfera inerte. Se añadieron entonces 4 ml de suero fisiológico y 20 µg de SnCl₂ · 2H₂O. A continuación, se añadió 1 ml de una solución de 185 MBq/ml de pertecnetato sódico (Na⁺ ^{99m}TcO₄⁻). Se agitó la solución durante 1 minuto y se evaluó la pureza radioquímica (PRQ) filtrando 1 ml de la solución con un filtro de 0,22 µm y enjuagando el filtro con 5 ml de suero fisiológico.

La pureza radioquímica corresponde a:

25 $PRQ = (\text{actividad sobre el filtro/actividad total}) \times 100;$

En el ejemplo 2, es superior al 99%.

30 Visualización gammagráfica de la biodistribución después de inyección intravenosa en ratas

Después del marcado, 4 MBq de las partículas de almidón oxidado al 20% marcadas con ^{99m}Tc, se inyectaron intravenosamente (vena peneana) en ratas Wistar macho que pesaban aproximadamente 200 g. Inmediatamente después de la inyección, y, entonces, 15 minutos después se obtuvo una gammagrafía de 30 kCps. Después de una fase de visualización de los pulmones (región superior), del hígado y del bazo (región derecha inferior), la actividad se concentró rápidamente (a los 15 minutos) en el hígado y en el bazo (punto fijado en la región más inferior derecha de la imagen) (figuras 2 y 3).

40 **Nº 3: Partículas de almidón oxidado de patata acopladas a la cadaverina como radiotrazadores, utilizadas para la imagen gammagráfica de la perfusión pulmonar**

Oxidación controlada de las partículas de almidón:

Se dispersaron 10 g (correspondientes a 0,055 moles de la unidad de glucosa) del almidón de la patata (almidón original de la patata según la monografía de la farmacopea europea) tamizados entre 36 y 50 µm, en 100 ml de agua. 0,028 moles de peryodato sódico (NaIO₄), es decir, 6 g, se añadieron previamente disueltos en 100 ml de agua. La suspensión se agitó durante 18 horas a temperatura ambiente. Después de este tiempo, se obtuvo una suspensión de partículas del almidón oxidado al 50%. El almidón oxidado se recuperó mediante centrifugación, enjuagándose entonces tres veces con 200 ml de agua.

50 Funcionalización del almidón oxidado mediante conjugación a la cadaverina

Se incubaron 10 g de almidón oxidado, es decir, 0,055 moles de unidades de glucosa, en 600 ml de agua y se pusieron en contacto con 4 g de cadaverina (NH₂(CH₂)₅NH₂) disuelta en 100 ml de agua, es decir, 0,0385 moles de cadaverina, es decir 0,077 moles de NH₂ (1,4 Eq) durante 18 horas, a temperatura ambiente. Para estabilizar la imina formada, 5,6 g de NaBH₄, es decir, 0,15 moles, se añadieron a la suspensión de almidón modificado, agitando durante 1 hora. Las partículas se decantaron entonces, se filtraron y se lavaron 3 veces con 200 ml de agua, liofilizándose entonces.

60 Reacción del marcado con ^{99m}Tc:

Se situaron 20 mg de almidón liofilizado y conjugado a la cadaverina en matraz de elución bajo atmósfera inerte. Se añadieron entonces 4 ml de suero fisiológico y 60 µg de SnCl₂ · 2H₂O. A continuación, se añadió 1 ml de una solución de 185 MBq/ml de pertecnetato sódico (Na⁺ ^{99m}TcO₄⁻). Se agitó la solución durante 1 minuto y se evaluó la pureza radioquímica (PRQ) filtrando 1 ml de la solución con un filtro de 0,22 µm y enjuagando el filtro con 5 ml de suero fisiológico.

65

La pureza radioquímica corresponde a:

$$\text{PRQ} = (\text{actividad sobre el filtro/actividad total}) \times 100;$$

5 En el ejemplo 3, es superior al 95%.

Visualización gammagráfica de la biodistribución después de inyección intravenosa en ratas

10 Después del marcado, 4 MBq de las partículas de almidón oxidado al 50% unidas a la cadaverina, marcadas con ^{99m}Tc , se inyectaron intravenosamente (vena peneana) en ratas Wistar macho que pesaban aproximadamente 200 g. Inmediatamente después de la inyección, y a los 15, 30 y 90 minutos después se llevó a cabo una gammagrafía de 30 kCps (figuras 4 a 5). Después de una fase de visualización exclusiva los pulmones la actividad del bazo y de los riñones aumentó rápidamente, disminuyendo la de los pulmones después de los 90 minutos. En las figuras 4 a 6, puede apreciarse la ausencia significativa de actividad en el hígado, igualmente, la buena visibilidad en la imagen inicial pulmonar y la casi completa ausencia de visualización hepática y esplénica, también son dignas de mención. 15 A los 30 minutos, el bazo y el inicio de fijación de los riñones, pueden apreciarse, aumentando sustancialmente estos dos órganos a los 90 minutos con una notable disminución en la actividad pulmonar.

Nº 4: Partículas de almidón oxidado de la patata unidas a la cadaverina como un radiotrazador sin utilizar reductores metálicos (SnCl_2) para la imagenología gammagráfica de la perfusión pulmonar

Oxidación controlada de las partículas de almidón:

25 Se dispersaron 10 g (correspondientes a 0,055 moles de la unidad de glucosa) del almidón de la patata (almidón original de la patata según la monografía de la farmacopea europea) tamizados entre 36 y 50 μm , en 100 ml de agua. 0,028 moles de peryodato sódico (NaIO_4), es decir, 6 g, se añadieron previamente disueltos en 100 ml de agua. La suspensión se agitó durante 18 horas a temperatura ambiente. Después de este tiempo, se obtuvo una suspensión de partículas del almidón oxidado al 50%. El almidón oxidado se recuperó mediante centrifugación, enjuagándose entonces tres veces con 200 ml de agua. 30

Funcionalización del almidón oxidado mediante unión a la cadaverina

35 Se incubaron 10 g de almidón oxidado, es decir, 0,055 moles de unidades de glucosa, en 600 ml de agua y se pusieron en contacto con 4 g de cadaverina ($\text{NH}_2(\text{CH}_2)_5\text{NH}_2$) disuelta en 100 ml de agua, es decir, 0,0385 moles de cadaverina, es decir 0,077 moles de NH_2 (1,4 Eq) durante 18 horas, a temperatura ambiente. Para estabilizar la imina formada, 5,6 g de NaBH_4 , es decir, 0,15 moles, se añadieron a la suspensión de almidón modificado, agitando durante 1 hora. Las partículas se decantaron entonces, se filtraron y se lavaron 3 veces con 200 ml de agua, liofilizándose entonces.

Reacción de marcado con ^{99m}Tc sin utilizar un agente reductor

45 Se situó 1 ml de 185 MBq/ml una solución de pertechnetato ($\text{Na}^+ \text{}^{99m}\text{TcO}_4$) en un matraz Isolink™ que contenía la mezcla siguiente en forma liofilizada: 8,5 mg de tartrato sódico, 2,85 mg de tetraborato sódico, 7,15 mg de carbonato sódico y 4,5 mg de borocarbonato sódico. El matraz se puso en un baño de agua caliente a 100°C durante 20 min. La solución obtenida se neutralizó añadiendo 1 ml de una solución de ácido clorhídrico (HCl) 0,1 N. Después de la neutralización, la solución se situó en un matraz bajo atmósfera inerte, que contenía 20 mg del almidón oxidado unido a la cadaverina.

50 La suspensión se agitó durante 15 minutos y la pureza radioquímica (PRQ) se evaluó filtrando 1 ml de la solución en un filtro de 0,22 μm , y enjuagando el filtro con 5 ml de suero fisiológico.

La pureza radioquímica corresponde a:

$$\text{PRQ} = (\text{actividad del filtro/actividad total}) \times 100;$$

55 En el ejemplo 4, es superior al 95%.

Visualización gammagráfica de la biodistribución después de inyección intravenosa en ratas

60 Después del marcado, 4MBq de partículas de almidón oxidado al 50% unidas a la cadaverina marcada con ^{99m}Tc se inyectaron intravenosamente (vena peneana) en ratas Wistar macho que pesaban 200 g aproximadamente. Inmediatamente después de la inyección se llevó a cabo una gammagrafía dinámica continua durante 90 minutos a intervalos de 30 segundos (figuras 7 a 9). Después de 5 minutos (figura 7), se observó una visualización casi exclusiva de los pulmones y unas actividades hepática y renal bajas. Se observó, a los 15 minutos (figura 8) y 30 minutos (figura 9) después de la inyección una actividad pulmonar estable. En las figuras 7 a 9, debe ponerse de manifiesto la ausencia de actividad significativa en el bazo, durante el tiempo indicado. De la misma forma, no se 65

observó un aumento en la actividad hepática y renal durante este tiempo (figuras 8 y 9), lo que se explica por el alto nivel de estabilidad de la captura pulmonar.

Nº 5: Acoplamiento de las micropartículas de almidón oxidado con las poliaminas naturales

Se incubaron partículas de almidón de patata oxidado al 50% con peryodato preparadas según el ejemplo 1, (18 horas a temperatura ambiente), en presencia de cadaverina. Después del análisis morfológico mediante la microscopia óptica (figuras 10 y 11) y granulometría usando un contador Coulter Multisizer[™] (figura 12), las partículas acopladas a la cadaverina parecían ser bastante homogéneas en términos de morfología (figura 11) y en términos de su distribución (figura 12). Es importante escoger una distribución homogénea del tamaño de la partícula para aumentar la proporción de partículas bloqueadas en los capilares pulmonares, con un óptimo de aproximadamente de 20 a 40 μm . Por debajo de 10 μm las partículas corren en riesgo de no detenerse correctamente en el pulmón y de ser capturadas por el sistema de los fagocitos mononucleados, en particular en el hígado y el bazo.

Nº 6: Preparación que optimiza las partículas unidas a la cadaverina, y preparación de las formulaciones A, B, C

Para optimizar las preparaciones de micropartículas se establecieron diversos planes para determinar los parámetros óptimos de la reacción para acoplar el almidón oxidado a la cadaverina. Un primer plan experimental hizo posible revelar los factores que afectan o no a la reacción de acoplamiento. Un segundo plan experimental hizo posible determinar cuantitativamente la influencia de los parámetros experimentales y obtener de este modo las condiciones de reacción que mejor encajen con la producción de micropartículas capaces efectivamente de formar un complejo con $^{99\text{m}}\text{Tc}$.

El primer plan experimental hizo posible, basándose en 14 experimentos, (Tabla 1), determinar la influencia cualitativa de 4 variables experimentales, (B1: temperatura de la reacción; B2: tiempo de reacción; B3: valor equivalente del agente de reducción; B4: tiempo de reducción). Cada una de las variables experimentales se ensayó a 2 niveles, uno inferior y otro superior. En todos los experimentos, la respuesta se evaluó midiendo el porcentaje de nitrógeno contenido en las micropartículas finales (fuente de juicio principal medido mediante análisis elemental), los rendimientos de la reacción de acoplamiento y la distribución granulométrica de las micropartículas obtenidas (contador Coulter Multisizer[™]). Los resultados obtenidos (figura 13) indican la débil influencia o la falta de influencia de los parámetros particulares de la (B3: valor equivalente del agente de reducción; B4: tiempo de reducción) sobre el contenido de nitrógeno de las micropartículas finales y, contrariamente, la influencia significativa y bastante positiva de la temperatura y del tiempo de reacción. El aumento en la temperatura y en el tiempo de reacción, permite, por tanto, que el acoplamiento de la cadaverina a las micropartículas de almidón oxidado aumente, siendo más favorable, por tanto, a la formación de otro complejo de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ mediante las micropartículas.

Tabla 1: Plan experimental nº 1, que estudia la influencia cualitativa de 4 factores (B1, B2, B3 y B4) sobre la respuesta en el tamaño y porcentaje del nitrógeno en las micropartículas del almidón al final de la reacción de acoplamiento.

Exp. Nº	B1	B2	B3	B4	Tamaño medio (μm)	% partículas <10 μm	% nitrógeno
1	25	4	1	15	30	12	7,67
2	25	18	10	60	18	23	9,10
3	40	4	10	60	28	15	10,30
4	40	18	1	60	28	13	11,14
5	40	18	10	15	24	19	11,00
6	40	18	1	15	21	16	11,00
7	40	4	10	15	30	12	11,20
8	40	4	1	60	26	12	9,74
9	25	18	10	15	23	14	9,28
10	25	18	1	60	19	22	9,41
11	25	18	1	60	21	15	9,94
12	25	18	1	60	25	9	9,92
13	25	18	1	60	19	20	10,02
14	25	4	10	60	30	8	7,66

Con respecto al segundo plan experimental se llevó a cabo de forma que pudiera optimizar cuantitativamente el acoplamiento y modelar la respuesta a variaciones de distintos planes experimentales sobre el contenido de nitrógeno de las micropartículas. El segundo plan experimental incluyó 25 experimentos y se basó en la utilización de una matriz Doelhart (Tabla 2). Los parámetros estudiados fueron el número del valor equivalente amina/almidón (ensayado en 5 niveles), el pH de la reacción (ensayado a 7 niveles), el alcance de la oxidación del almidón (ensayado a 7 niveles), finalmente, la concentración del almidón en el medio reactivo (ensayado en 3 niveles). Como ocurrió en el primer plan experimental, para todos los experimentos, la respuesta se evaluó midiendo el porcentaje contenido de nitrógeno en las partículas finales y el rendimiento del acoplamiento (puntos principales de evaluación

mediante análisis elemental), así como la distribución granulométrica de las micropartículas obtenidas (punto secundario de evaluación medido con un contador Coulter Multisizer™). Los resultados obtenidos hicieron posible modelar la respuesta, en términos de rendimiento del acoplamiento, como una función de variaciones en los parámetros experimentales (figura 14). El círculo en la figura 14 representa, de forma bidimensional la región experimental estudiada durante el segundo plan experimental. Durante dicho segundo plan experimental, fue posible determinar las condiciones por las cuales el acoplamiento entre el almidón oxidado y la cadaverina se encuentra maximizado, con un rendimiento de aproximadamente 100% (parte superior derecha del círculo en la figura 14).

Todos estos resultados permitieron la optimización de preparaciones de micropartículas resultantes del acoplamiento del almidón oxidado y la cadaverina. Los planes experimentales se utilizaron para definir las condiciones experimentales ideales para obtener unas preparaciones de micropartículas con las propiedades requeridas para la aplicación deseada. Se obtuvieron pues, a partir de estos planes, tres tipos de formulaciones (A, B y C), que presentaban unas características morfológicas ideales para las aplicaciones diagnósticas en la imaginología médica.

Tabla 2: Plan experimental nº 2, que estudia la influencia cuantitativa de cuatro factores -el valor equivalente amina/almidón/ensayado en cinco niveles), el pH reactivo (ensayado en 7 niveles), el nivel de oxidación del almidón (ensayado en 7 niveles) y, finalmente, la concentración de almidón en el medio de reacción (ensayado en 3 niveles) -sobre la respuesta mediante el rendimiento de la reacción y el porcentaje de nitrógeno en las micropartículas de almidón al final de la reacción de acoplamiento.

Experimento Nº	Equivalente	pH	% de oxidación	Almidón (mM/L)	Rendimiento del acoplamiento [%]	Nitrógeno [%]
1	2,50	8,50	40,00	80,00	3,78	0,32
2	0,50	8,50	40,00	80,00	52,21	4,42
3	2,00	11,50	40,00	80,00	7,09	0,60
4	1,00	5,50	40,00	80,00	2,13	0,18
5	2,00	5,50	40,00	80,00	2,24	0,19
6	1,00	11,50	40,00	80,00	74,66	6,32
7	2,00	9,50	65,00	80,00	75,74	8,84
8	1,00	7,50	15,00	80,00	8,54	0,33
9	2,00	7,50	15,00	80,00	4,14	0,16
10	1,50	10,50	15,00	80,00	35,19	1,36
11	1,00	9,50	65,00	80,00	77,11	9,00
12	1,50	6,50	65,00	80,00	52,69	6,15
13	2,00	9,50	46,25	100,00	94,20	8,82
14	1,00	7,50	33,75	60,00	87,57	6,54
15	2,00	7,50	33,75	60,00	78,06	5,83
16	1,50	10,50	33,75	60,00	104,31	7,79
17	1,50	8,50	58,75	60,00	86,50	9,48
18	1,00	9,50	46,25	100,00	94,09	8,81
19	1,50	6,50	46,25	100,00	74,97	7,02
20	1,50	8,50	21,25	100,00	34,54	1,79
21	1,50	8,50	40,00	80,00	87,89	7,44
22	1,50	8,50	40,00	80,00	65,09	5,51
23	1,50	8,50	40,00	80,00	49,02	4,15
24	1,50	8,50	40,00	80,00	83,04	7,03
25	1,50	8,50	40,00	80,00	91,31	7,73

Preparación de la formulación A

Se incubaron 4 g del almidón oxidado al 50%, es decir, 0,022 moles de unidades de glucosa, en 120 ml de agua y se pusieron en contacto con 2.268 mg de cadaverina ($\text{NH}_2(\text{CH}_2)_5\text{NH}_2$) disuelta en 120 ml de agua. La suspensión se agitó durante 18 horas en un lugar oscuro a una temperatura de 40°C. Para establecer la imina formada, 420 mg de NaBH_4 disueltos en 10 ml de agua, se añadieron a la suspensión de almidón modificado bajo agitación durante 15 minutos. Las partículas se decantaron entonces, se filtraron y se lavaron tres veces con 200 ml de agua, liofilizándose entonces.

Preparación de la formulación B

Se incubaron 4 g del almidón oxidado al 58,75%, es decir, 0,022 moles de unidades de glucosa, en 120 ml de agua y se pusieron en contacto con 4.048 mg de cadaverina ($\text{NH}_2(\text{CH}_2)_5\text{NH}_2$) disuelta en 250 ml de agua ajustando el pH de la suspensión a 8,8. La suspensión se agitó durante 18 horas en un lugar oscuro a una temperatura de 40°C. Para establecer la imina formada, 760 mg de NaBH_4 disueltos en 10 ml de agua, se añadieron a la suspensión de

almidón modificado bajo agitación durante 60 minutos. Las partículas se decantaron entonces, se filtraron y se lavaron tres veces con 200 ml de agua, liofilizándose entonces.

Preparación de la formulación C

5 Se incubaron 4 g del almidón oxidado al 65%, es decir, 0,022 moles de unidades de glucosa, en 120 ml de agua y se pusieron en contacto con 2.920 mg de cadaverina ($\text{NH}_2(\text{CH}_2)_5\text{NH}_2$) disuelta en 158 ml de agua ajustando el pH de la suspensión a 8,8. La suspensión se agitó durante 18 horas en un lugar oscuro a una temperatura de 40°C. Para establecer la imina formada, 420 mg de NaBH_4 disueltos en 10 ml de agua, se añadieron a la suspensión de almidón modificado bajo agitación durante 60 minutos. Las partículas se decantaron entonces, se filtraron y se lavaron tres veces con 200 ml de agua, liofilizándose entonces.

Nº 7: Biodistribución y metabolización de las partículas acopladas a la cadaverina

15 Se estudió el perfil farmacocinético de las micropartículas acopladas a la cadaverina (formulaciones A, B, C, del ejemplo 6), después del acomplejamiento de ^{99m}Tc y de la administración intravenosa.

Para hacer esto, se llevaron a cabo, en animales sanos, dos tipos de estudio:

- 20 - estudios gammagráficos estáticos y dinámicos;
- estudios de la biodistribución de las micropartículas de almidón y de la separación cromatográfica de los metabolitos urinarios.

25 a) Estudios gammagráficos

Los estudios gammagráficos se llevaron a cabo utilizando distintos kits preparados para su utilización, que contenían 50 μg de SnCl_2 y 20 mg de micropartículas de las formulaciones A, B y C implicadas, preparadas según el ejemplo 6. Después de marcado con una solución de pertecnetato sódico ($^{99m}\text{TcO}_4$), se evaluó la pureza radioquímica de los distintos kits, siendo los resultados, en cada caso, mayores que el 95% (Tabla 3).

Tabla 3: Características *in vitro* e *in vivo* de tres kits distintos preparados para su utilización, que contenían 50 μg de SnCl_2 y 20 mg de micropartículas de las formulaciones implicadas (A, B y C)..

Kit	Pureza Bioquímica (%)	Tamaño (μm)	% de partículas <10 μm	Semivida biológica pulmonar (h)	Actividad pulmonar/vascular (t=30 min)	Actividad pulmonar/hepática (t=30 min)
Formulación A	96 \pm 1	5-80	17 \pm 1	1,4 \pm 0,17	84 \pm 44	100 \pm 63
Formulación B	98 \pm 1	5-70	33 \pm 7	1,4 \pm 0,25	133 \pm 18	94 \pm 12
Formulación C	98 \pm 2	5-90	30 \pm 3	3 \pm 0,50	310 \pm 116	99 \pm 34

35 Los estudios dinámicos se llevaron a cabo en ratas Wistar macho (n=3) durante 120 min (figura 15). Hicieron posible establecer normas tiempo-actividad (figura 16), a partir de las cuales se pudieron obtener tasas diversas de actividad (Tabla 3). También se realizaron gammagrafías estáticas, junto con imaginología exploratoria mediante escaneo, para dibujar anatómicamente la distribución del trazador en tiempos distintos (figura 17).

40 Estos diversos estudios hicieron posible observar una localización predominantemente pulmonar del trazador después de inyección intravenosa (figura 15 y 17), con una semivida biológica pulmonar entre 1,5 y 3 horas, dependiendo de la formulación (Tabla 3). Las curvas de tiempo-actividad obtenidas durante los estudios dinámicos revelaron una eliminación renal y urinaria del trazador con perfiles de actividad hepática, digestiva y vascular que permaneció constante a lo largo del tiempo (figura 16).

Las características *in vitro* e *in vivo* de la formulación C son:

- 50 - Pureza radioquímica (%): 98 \pm 2;
- Tamaño de partícula entre 4 y 90 μm ;
- Semivida biológica pulmonar (h): 3 \pm 0,50;
- Relación actividad vascular/actividad vascular [t=30min]: 310 \pm 116.

55 Estas características las hacen extremadamente adecuadas para su utilización clínica como un radiofármaco para la imaginología gammagráficas de la perfusión pulmonar.

b) Estudio de biodistribución:

60 Los estudios de biodistribución se llevaron a cabo utilizando kits preparados para su utilización que contenían 50 μg de SnCl_2 y 20 mg de micropartículas de la formulación C (poseyendo ésta las características gammagráficas más

conductoras. Después de un marcado con una solución de pertecnetato sódico ($^{99m}\text{TcO}_4$), se inyectó intravenosamente en ratas Wistar macho ($n=8$), 10 MBq de una suspensión de micropartículas de almidón marcadas con ^{99m}Tc . A los 15 y 120 minutos después de la inyección, los animales se sacrificaron ($n=4$ para cada tiempo), obteniendo sus órganos, lavándolos, pesándolos y realizando un conteo con un contador gamma. Los resultados confirmaron la distribución pulmonar del trazador, ya que más del 80% de la actividad inyectada se encontró en los pulmones (Tabla 4). Esta actividad pulmonar era relativamente estable, pues después de 120 minutos, el 70% de la actividad inyectada, se encontraba todavía en los pulmones. La eliminación del trazador, tal como se reveló durante los estudios gammagráficos, fue principalmente urinaria.

10 **Tabla 4:** Estudio de la biodistribución de las micropartículas de almidón marcadas con ^{99m}Tc (formulación C), 15 y 120 minutos después de la inyección intravenosa en ratas Wistar macho ($n=4$ para cada tiempo). Los resultados se expresan como porcentaje de la dosis inyectada (% D.I.) y como porcentaje de la dosis inyectada por gramo de órgano (% D.I./órgano).

Formulación C	% D.I. (15 min)	% D.I./g órgano(15 min)	% D.I. (120 min)	% D.I./g órgano (120 min)
Sangre	2,08 ± 0,27	0,13 ± 0,02	1,83 ± 0,27	0,11 ± 0,01
Pulmones	83,36 ± 2,54	70,25 ± 7,67	70,01 ± 1,07	54,66 ± 7,34
Hígado	2,44 ± 0,23	0,22 ± 0,05	2,44 ± 0,51	0,23 ± 0,06
Corazón	0,26 ± 0,12	0,31 ± 0,16	0,12 ± 0,04	0,15 ± 0,04
Bazo	0,15 ± 0,04	0,23 ± 0,04	0,24 ± 0,04	0,32 ± 0,05
Riñones	3,51 ± 0,16	1,63 ± 0,20	15,59 ± 1,19	6,98 ± 0,88
Vejiga	1,74 ± 1,24	8,40 ± 6,89	1,72 ± 0,25	3,67 ± 2,57
Cerebro	0,05 ± 0,01	0,03 ± 0,00	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,01
Estómago	0,33 ± 0,13	0,10 ± 0,04	0,86 ± 0,13	0,16 ± 0,10
Intestinos	0,82 ± 0,20	0,04 ± 0,01	3,46 ± 0,73	0,16 ± 0,03
Cuerpo sin vida sin órganos	5,30 ± 0,92	0,04 ± 0,01	3,50 ± 0,40	0,03 ± 0,00

15 Para completar estos resultados de la biodistribución, se llevó a cabo un estudio mediante la separación cromatográfica de los metabolitos urinarios. Después de la inyección intravenosa de micropartículas de almidón (formulación C) marcadas con ^{99m}Tc en ratas Wistar macho ($n=2$), los animales se situaron dentro de jaulas de metabolismo, que permitieron que se recolectara la orina durante las 12 horas después de administrar el trazador.

20 De este modo, se pudieron eluir diversas muestras urinarias utilizando columnas de penetración en gel de distintas porosidades (Sephadex G15, P6 y Sephadex G50), que hicieron posible obtener una primera caracterización de la distribución molecular de los metabolitos urinarios marcados radioactivamente (figura 18, 19 y 29). La elusión utilizando una columna Sephadex G15 con un límite de exclusión de 1.500 daltons (figura 18), reveló una distribución molecular superior al límite de exclusión para casi el 50% de los metabolitos urinarios. La elusión utilizando una columna P6 con un límite de exclusión de 5.000 daltons (figura 19), reveló una distribución molecular superior al límite de exclusión para casi el 40% al 50% de los metabolitos urinarios. Finalmente, la elusión utilizando una columna Sephadex G50 con un límite de exclusión de 10.000 daltons (20), reveló una distribución molecular superior al límite de exclusión para casi el 30 al 40% de los metabolitos urinarios. En conclusión, la cromatografía de penetración géllica contribuye a la información con respecto a la distribución molecular aproximada de los metabolitos urinarios, aproximadamente el 50% de dicha distribución, que está formada por moléculas más pequeñas que 1.500 daltons (que corresponden a 8 unidades de glucosa), aproximadamente el 10% de las moléculas con un tamaño de entre 1.500 y 5.000 daltons (entre 8 y 27 unidades de glucosa), aproximadamente el 10% de moléculas con un tamaño de 5.000 y 10.000 daltons (entre 27 y 55 unidades de glucosa), y, finalmente, el 30% aproximadamente de las moléculas mayores de 10.000 daltons.

30 Todos los estudios gammagráficos y de biodistribución que se llevaron a cabo con micropartículas de almidón modificado marcadas con ^{99m}Tc revelan resultados biológicos que son compatibles con la utilización *in vivo* de los radiofármacos. Las características de la liberación contable y de la homogeneidad del ^{99m}Tc a partir de su reservorio pulmonar después de inyección intravenosa, son el resultado de la combinación de:

- un tamaño y una morfología particularmente homogéneos;
- un buen control de la química para el acoplamiento del agente complejante;
- la elección de un agente complejante efectivo con respecto a la retención del trazador radioactivo ^{99m}Tc .

Referencias

50 Häfeli, UO 2001, Radioactive Microspheres For Medical Applications. En: Bulte J, de Kuyper M (eds) Focus on biotechnology. Kluwer Academic Publishing

- Häfeli UO, Casillas S, Dietz DW, Pauer GJ, Rybicki LA, Conzone SD, Day DE, Hepatic Tumor Radioembolization in a Rat Model Using 186/188 Radioactive Rhenium Glass Microspheres, *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*, Vol. 44, nº 1, pp. 189-199, 1999
- 5 Delgado HA, Diaz Acevedo RV, Evora Garcia CM, Mallol EJ, Soriano Torres MI, Microspheres of biodegradable synthetic polymers in the manufacture of reactive equipment for the preparation of radiopharmaceuticals. Patente ES 2096521, 1997.
- 10 Delgado A, Soriano I, Sanchez E, Oliva M, Evora C, Radiolabelled biodegradable microspheres for lung imaging. *Eur J Pharm Biopharm.* 2000 Sep; 50(2):227-36
- Kellaway IW, Seale L, Spencer PS. The in vitro characterization and biostability of ^{99m}Tc-dextran and its accumulation within the inflamed paws of adjuvant-induced arthritic rats. *Pharm Res.* 1995 Abr; 12(4):588-93
- 15 Akgun A, Tani Acar E, Taner MS, Ozcan Z, Ok E. Scintigraphic diagnosis of protein-losing enteropathy secondary to amyloidosis. *Turk J Gastroenterol.* 2005 Mar; 16(1):41-3
- 20 Paiva GR, Filho RS, Ferreira LM, Wagner J, Nogueira SA, Novo NF, Juliano Y, Rocha JL. Phytate technetium-^{99m} versus dextran 500 technetium-^{99m} in the sentinel lymph node biopsy. *Acta Radiol.* 2006 Feb; 47(1):65-70
- Andersson A, Capala J, Carlsson J. Effects of EGF-dextran-tyrosine-¹³¹I conjugates on the clonogenic survival of cultured glioma cells. *J Neurooncol.* 1992 Nov; 14(3):213-23
- 25 Line BR, Weber PB, Lukasiewicz R, Dansereau RN. Reduction of background activity through radiolabeling of antifibrin Fab' with ^{99m}Tc-dextran. *J Nucl Med.* 2000 Jul; 41 (7):1264-70.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para preparar una composición que comprende un polisacárido que presenta uno o más grupos acomplejantes obtenidos uniendo covalentemente la putrescina $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$, la espermina $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$, la espermidina $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$ o la cadaverina $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_5\text{NH}_2$, con dicho polisacárido, formando la totalidad o algunos de dichos grupos acomplejantes un complejo con por lo menos un metal polivalente, comprendiendo dicho procedimiento las etapas que consisten en:
- i) poner un polisacárido en contacto con un agente oxidante controlado,
 - ii) poner el polisacárido oxidado en contacto con un compuesto de acomplejamiento seleccionado de entre la putrescina, espermina, espermidina o cadaverina;
 - iii) opcionalmente, poner el polisacárido obtenido en la etapa ii) en contacto con un agente reductor; y
 - iv) poner el polisacárido obtenido en la etapa ii) o la etapa iii) en contacto con una sal metálica polivalente, siendo la sal metálica polivalente $^{99\text{m}}\text{Tc}$.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la etapa (iv) se lleva a cabo en presencia de agentes reductores de tipo estaño, borato y derivados o ácido ascórbico.
3. Composición que comprende un polisacárido que presenta uno o más grupos acomplejantes obtenidos uniendo covalentemente la putrescina $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$, la espermina $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$, la espermidina $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$, o la cadaverina $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_5\text{NH}_2$, con dicho polisacárido, formando todos o algunos de dichos grupos acomplejantes un complejo con por lo menos un metal polivalente, siendo el polisacárido de origen vegetal o microbiológico y seleccionado de entre almidón, celulosa, amilopectina, amilosa, agarosa, quitosán, pululano o dextrano, y las mezclas de dos o una pluralidad de los mismos, pudiendo dicha composición ser obtenida mediante un procedimiento que comprende las etapas que consisten en:
- i) poner en contacto un polisacárido con un agente oxidante controlado;
 - ii) poner en contacto el polisacárido oxidado con un compuesto de acomplejamiento seleccionado de entre la putrescina, espermina, espermidina o cadaverina;
 - iii) opcionalmente, poner en contacto el polisacárido obtenido en la etapa ii) con un agente reductor; y
 - iv) poner el polisacárido obtenido en la etapa ii) o la etapa iii) en contacto con una sal metálica polivalente. seleccionándose el metal polivalente de entre los isótopos radioactivos del tecnecio, renio, cobre, estroncio, indio, samario, estaño, escandio, itrio, galio, gadolinio o lutecio, prefiriéndose particularmente el $^{99\text{m}}\text{Tc}$.
4. Composición según la reivindicación 3, en la que el polisacárido está en forma de partículas.
5. Composición según la reivindicación 4, en la que el tamaño de partícula es de entre 10 nm y 200 μm .
6. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, que comprende además un excipiente farmacéuticamente aceptable.
7. Composición diagnóstica o farmacéutica para la farmacopea humana o animal, que comprende una composición según las reivindicaciones 3 a 6.
8. Utilización de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6 para la producción de una composición diagnóstica para la imagenología médica o veterinaria.
9. Utilización según la reivindicación 8 para la imagenología gammagráfica.
10. Utilización de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6 para la producción de una composición diagnóstica para el diagnóstico gammagráfico de un embolismo pulmonar.
11. Utilización según la reivindicación 9 para la detección de ganglios centinela o para linfogammagrafía.
12. Utilización de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6 para visualizar uno o más órganos en un paciente o en un animal mediante la imagenología médica.

13. Utilización según la reivindicación 12, en la que el órgano del que se ha obtenido la imagen es un pulmón, el hígado, el bazo, la médula ósea o los ganglios linfáticos.

5 14. Utilización de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6 para producir una composición farmacéutica para el tratamiento del cáncer en un paciente o un animal mediante radioterapia interna.

15. Utilización según la reivindicación 14, en la que el cáncer consiste en tumores de los ganglios linfáticos, o tumores hepáticos o esplénicos.

10

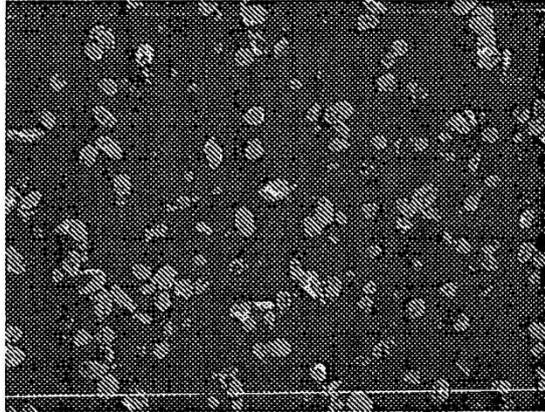


FIG.1

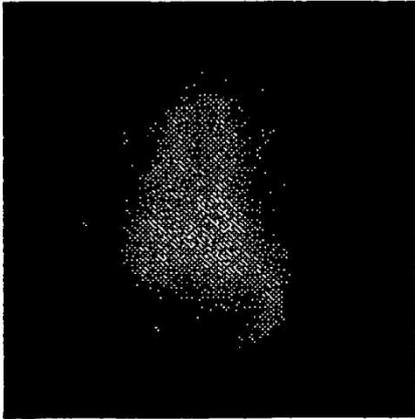


FIG.2

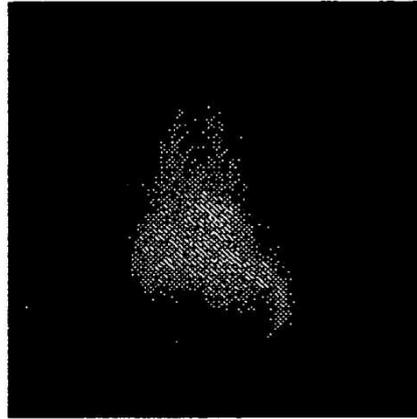


FIG.3

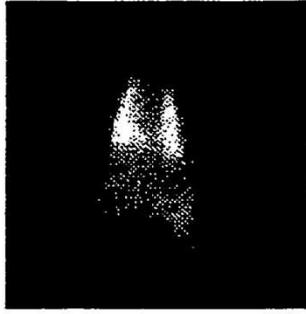


FIG. 4

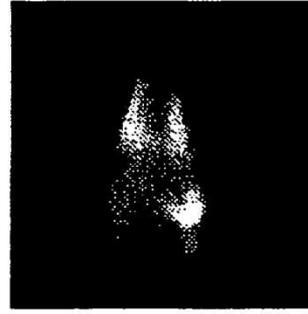


FIG. 5

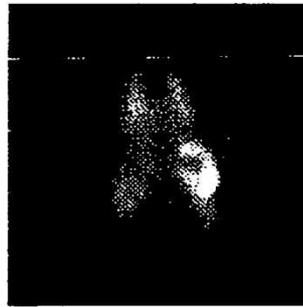


FIG. 6



FIG. 7



FIG. 8



FIG. 9

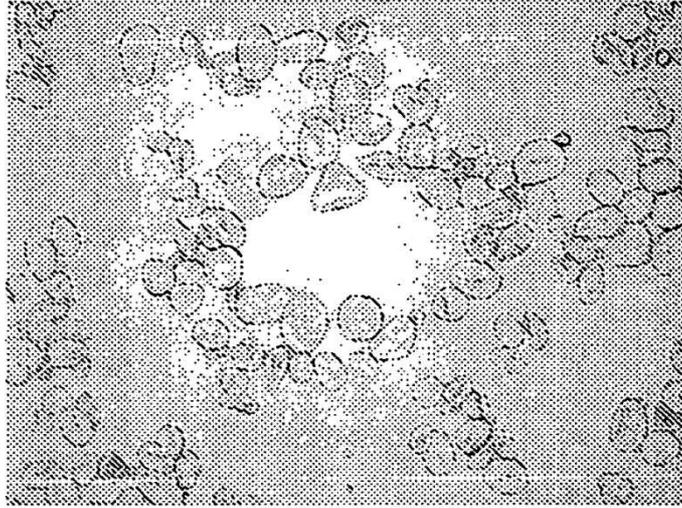


FIG.10

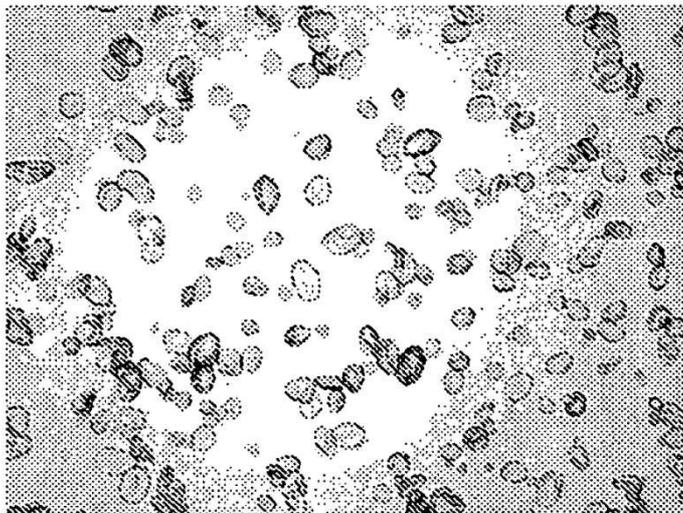


FIG.11

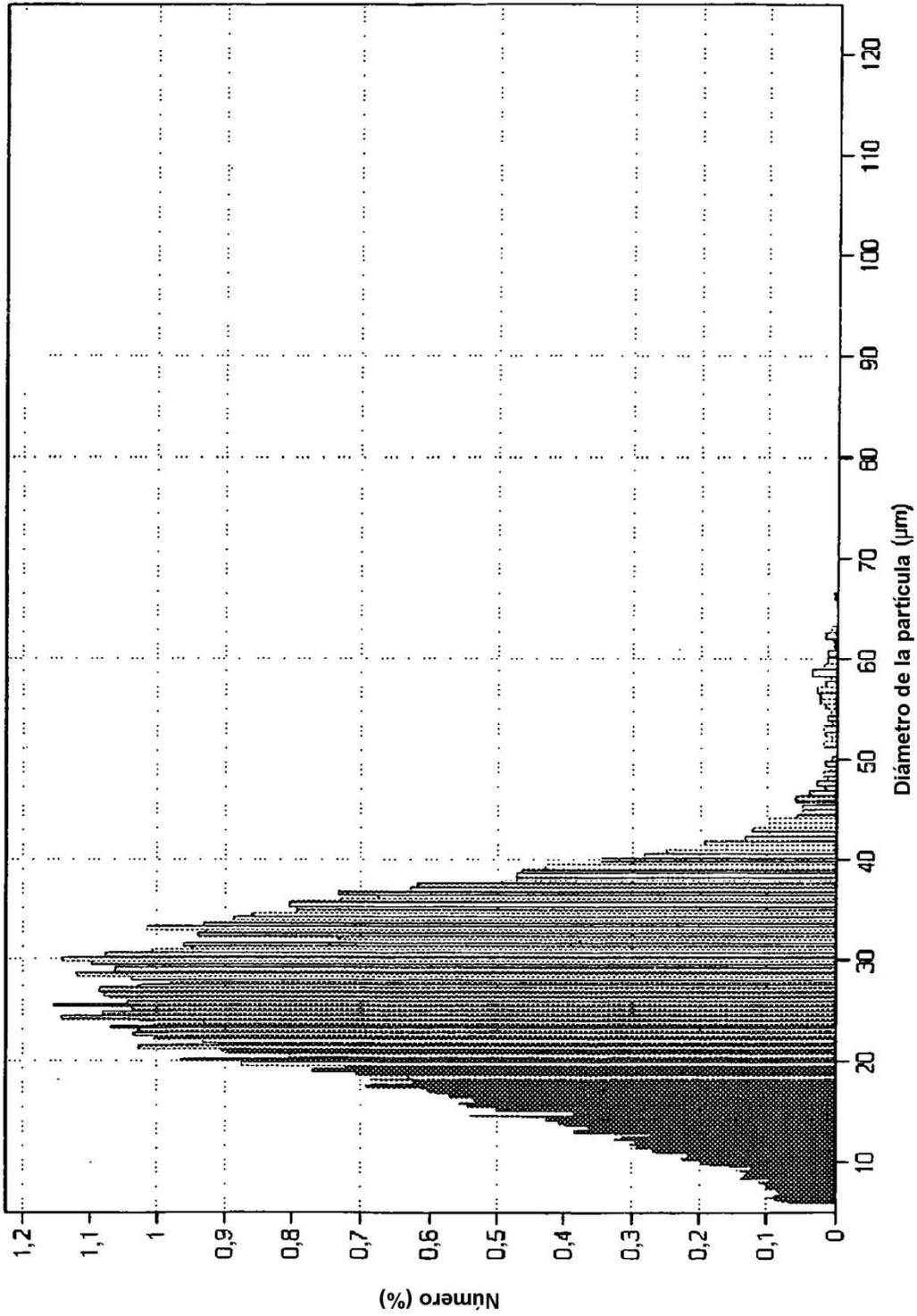


FIG.12

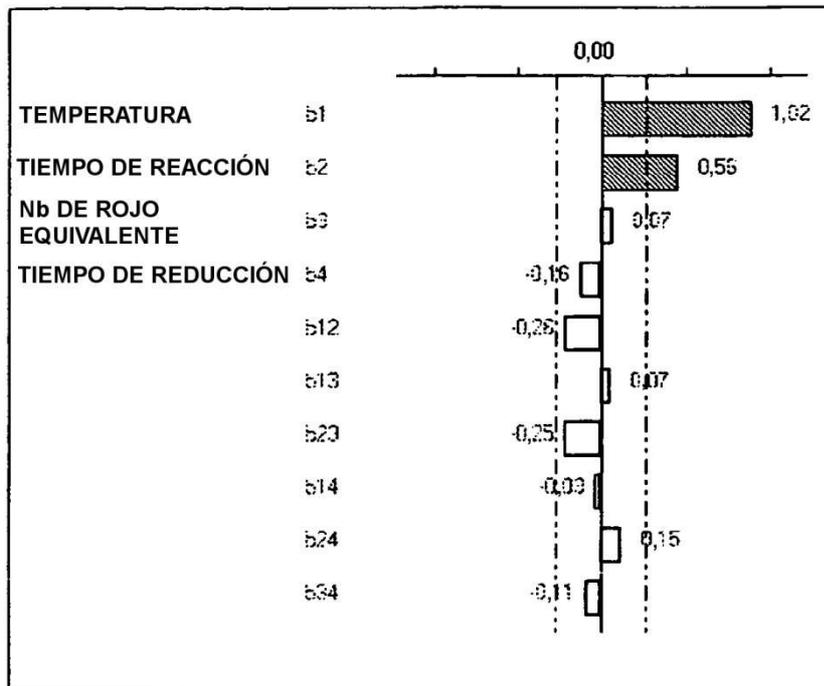


FIG.13

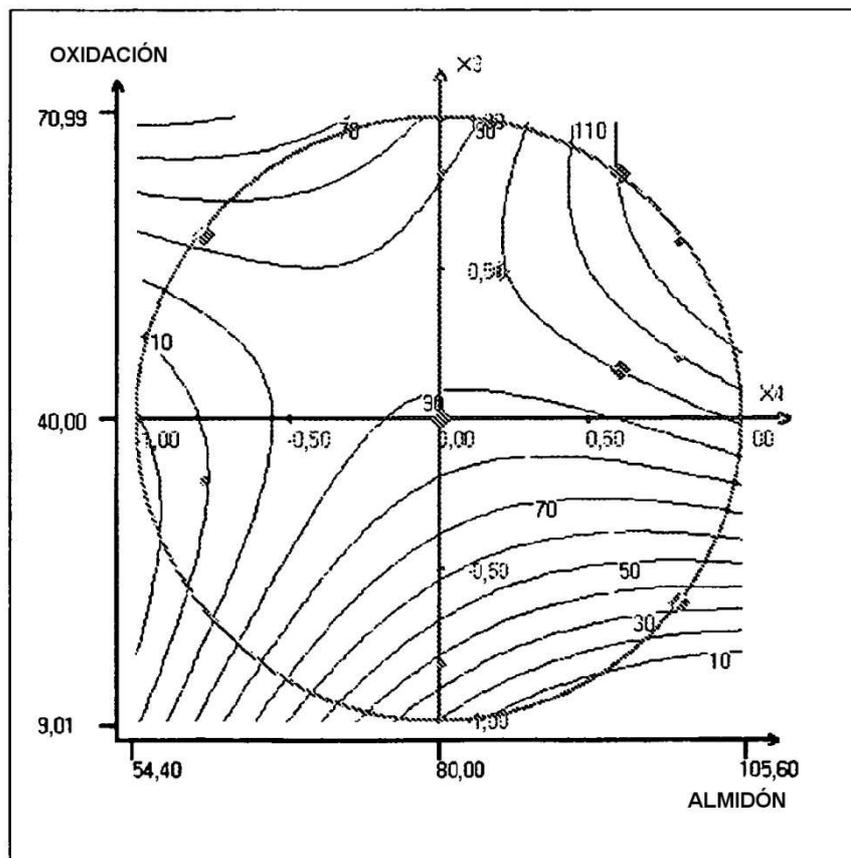


FIG.14

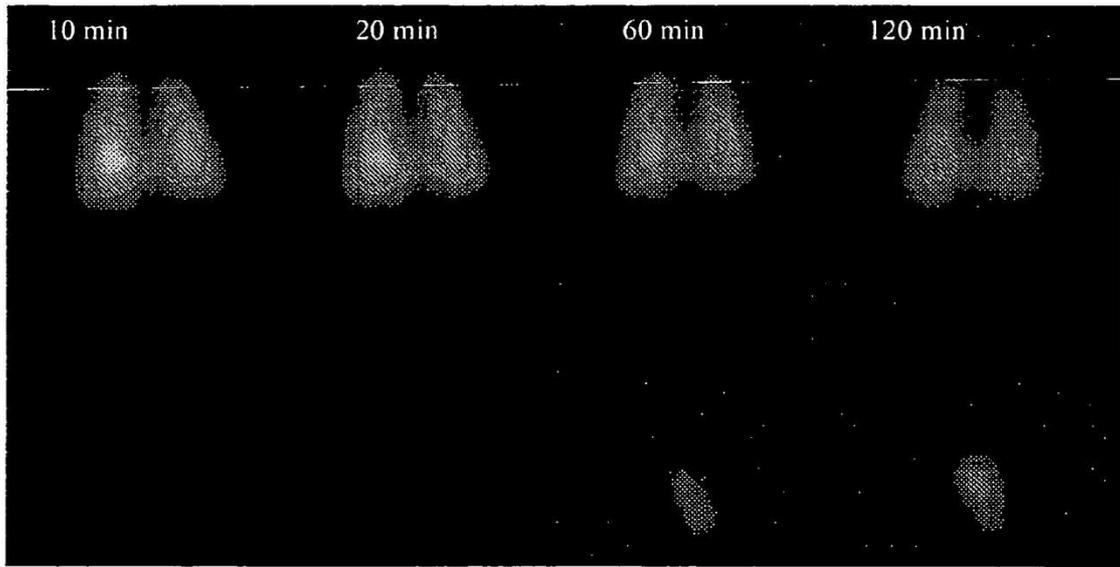


FIG.15

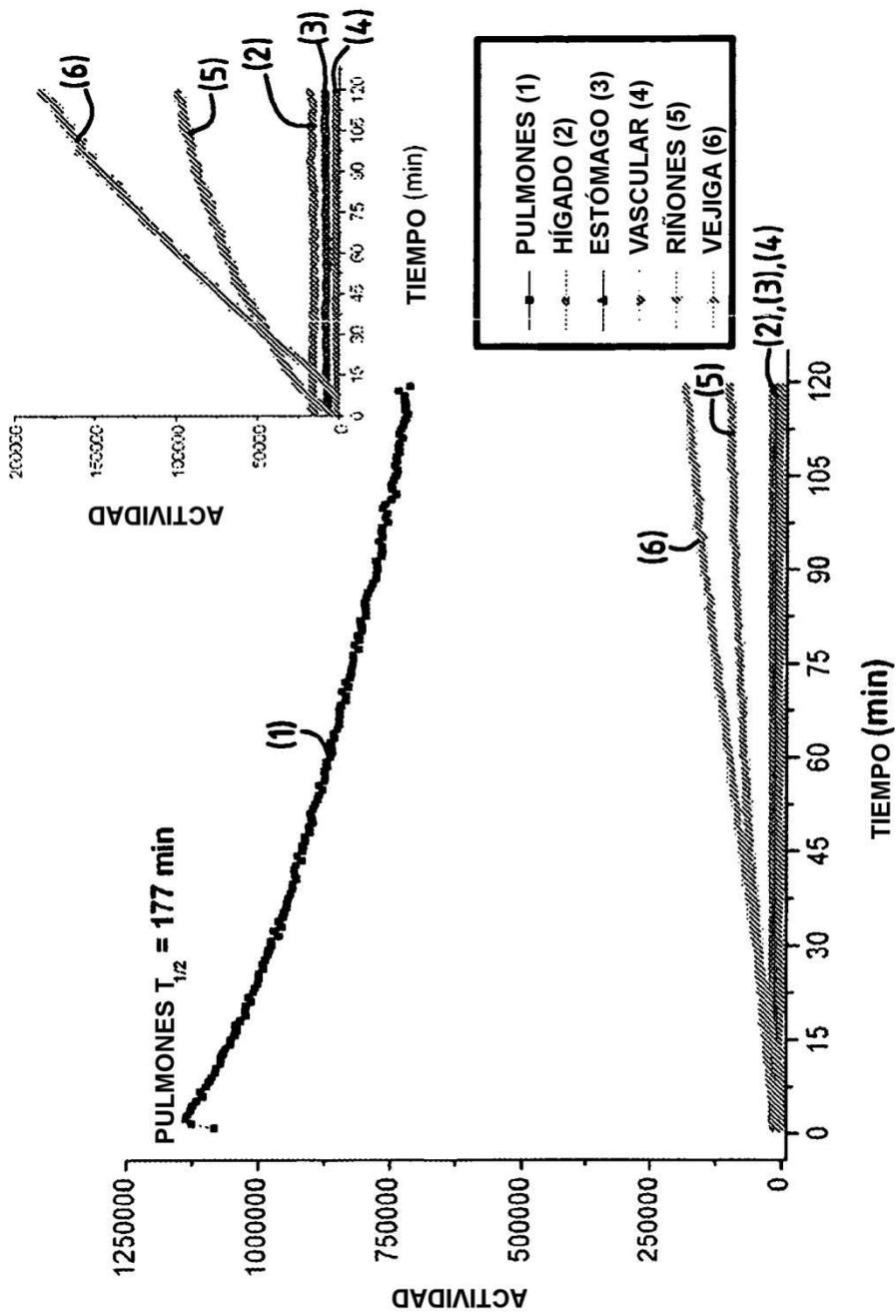


FIG.16

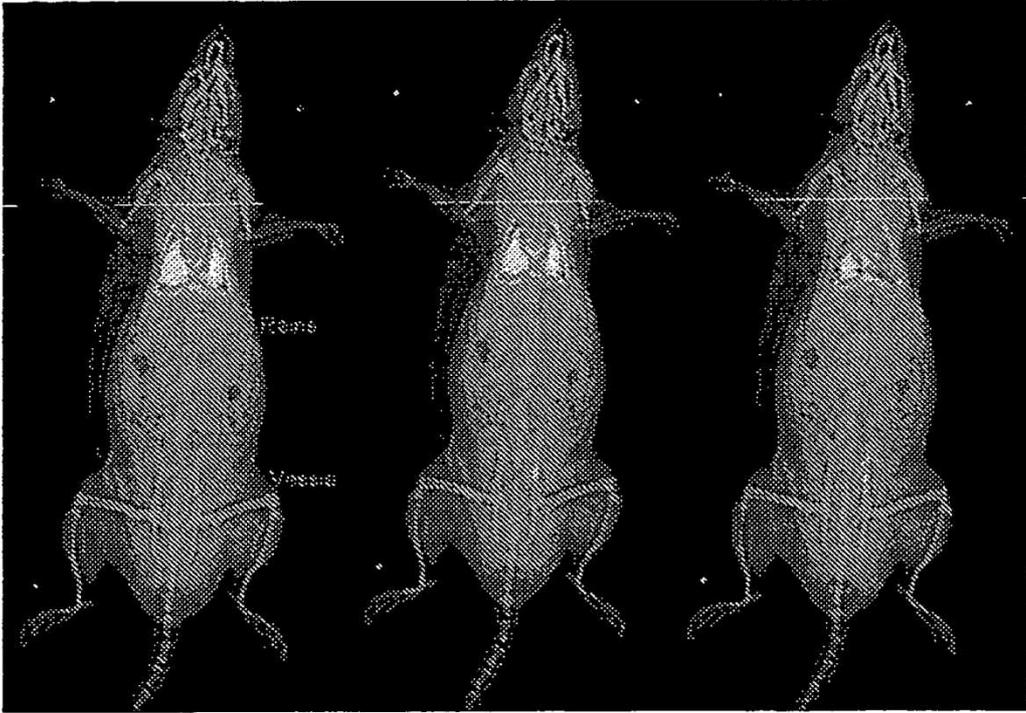


FIG.17

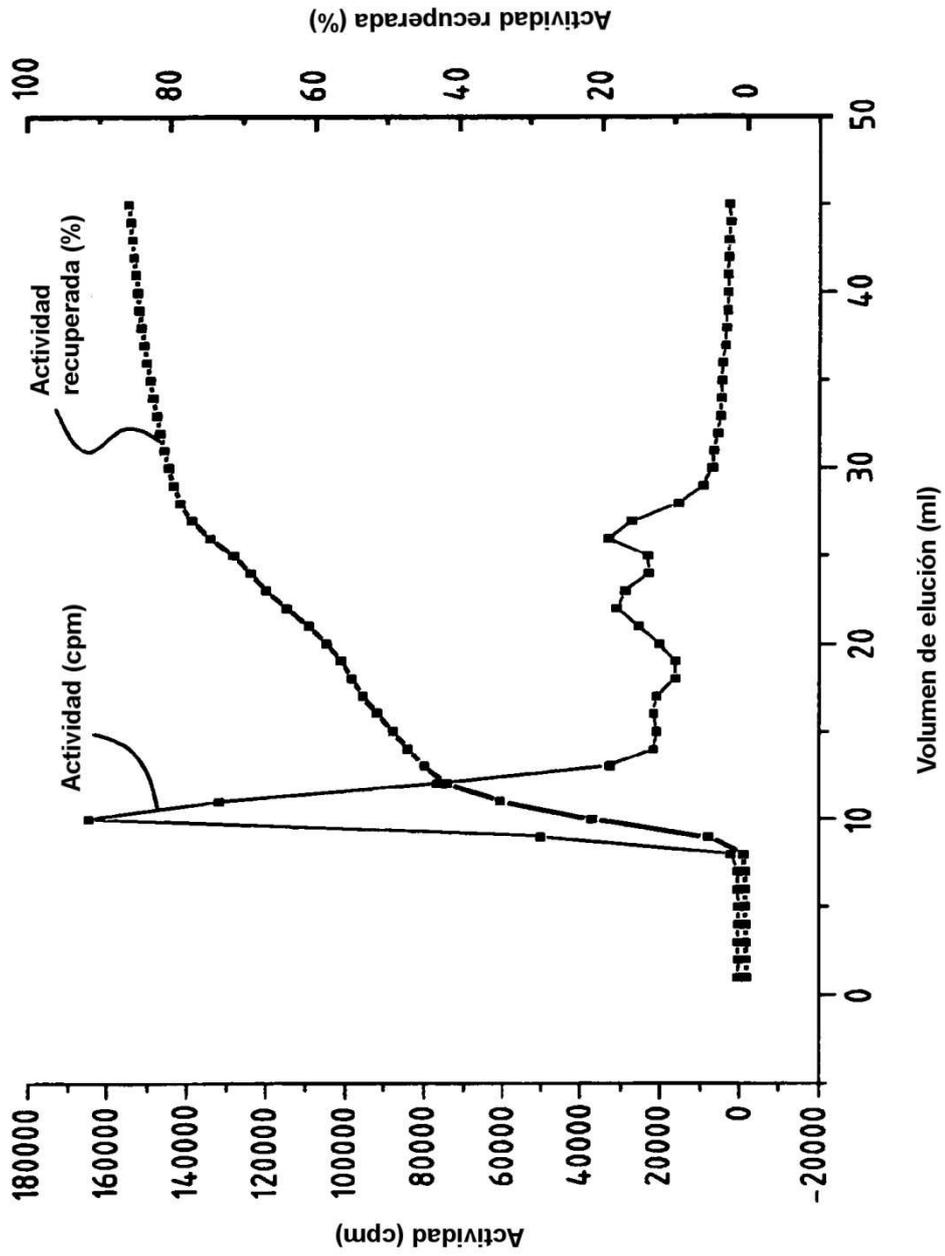


FIG.18

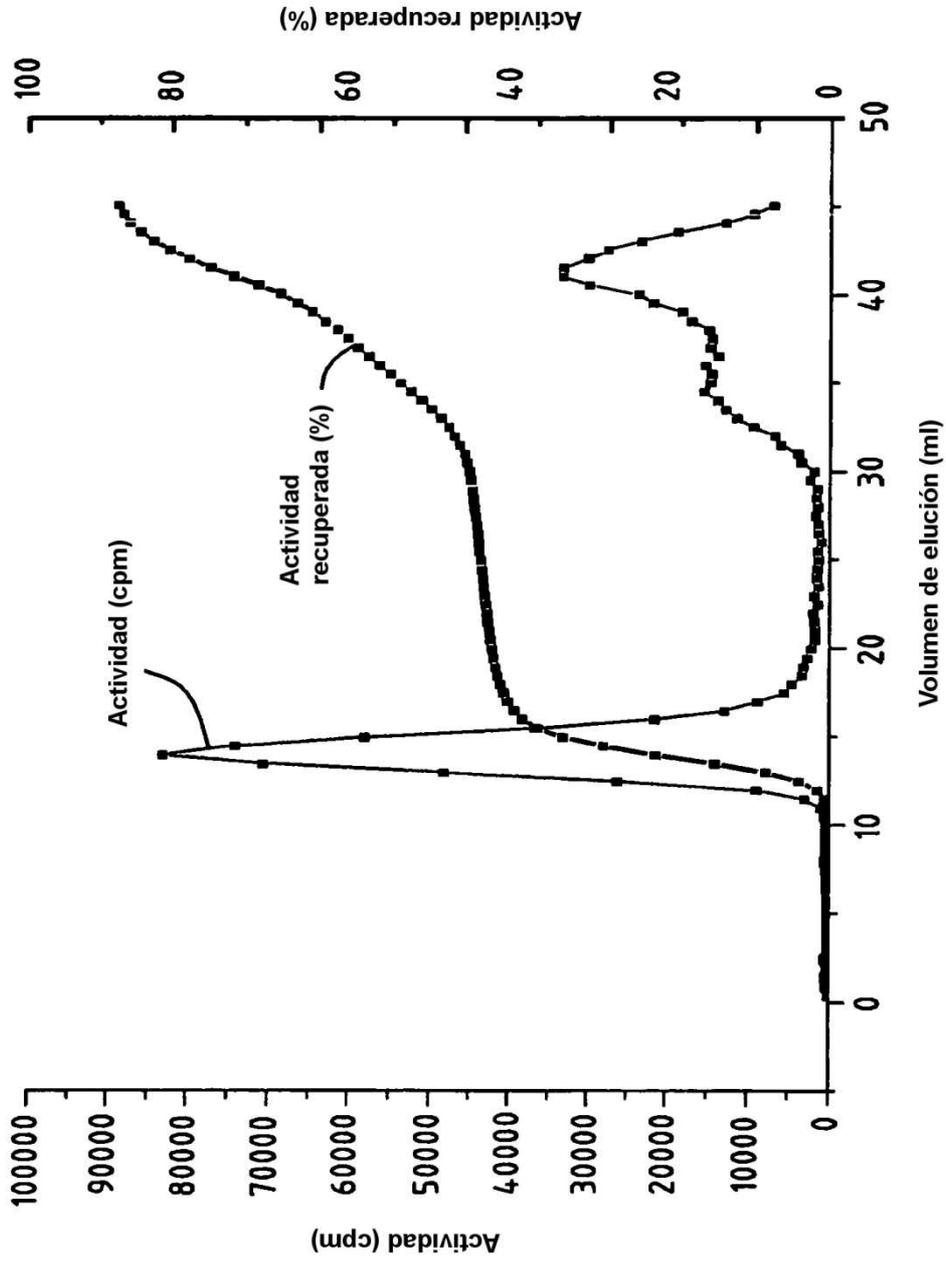


FIG.19

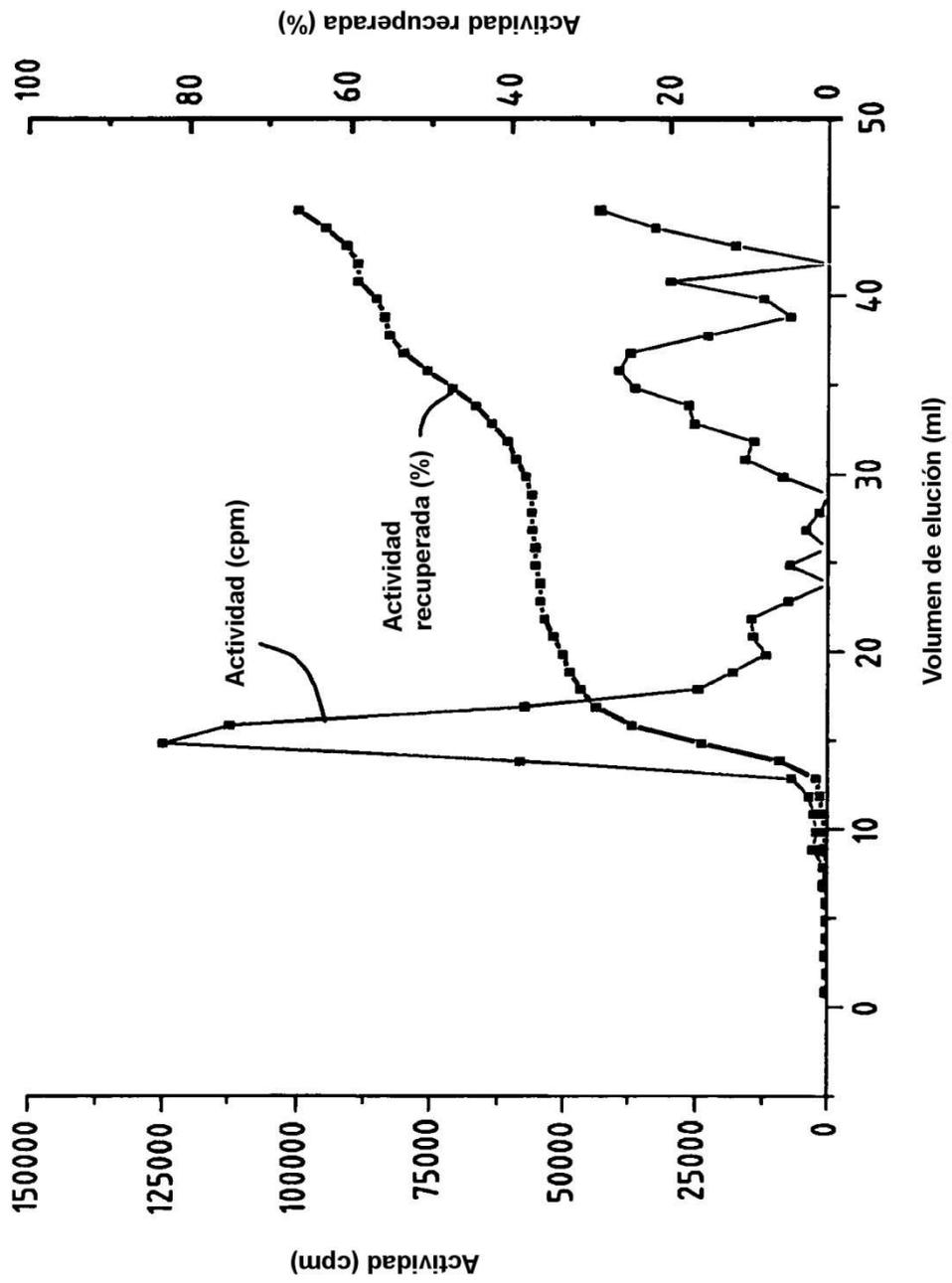


FIG.20