

355356

P.- 38.763
S.569 2 CA
* G 21
G

Memoria descriptiva



para solicitar CERTIFICADO DE ADICION **por** años

a nombre de ČESKOSLOVENSKÁ AKADEMIE VĚD

entidad / de nacionalidad checoeslovaca

con domicilio en Praga, Checoeslovaquia

por: "MEJORAS INTRODUCIDAS EN EL OBJETO DE LA PATENTE PRINCIPAL Nº 345.345, solicitada el 22 de Septiembre de 1.967 por: "Un procedimiento para la producción de derivados de la serie de la fluoresceína" (Clase Internacional G21g)



El presente invento se refiere a un método de preparar derivados de la serie de la fluoresceína marcados con isótopos radioactivos del mercurio.

En la memoria de la patente española número 345.345 se describen los métodos para preparar derivados de mercurio divalente que se derivan de compuestos de la serie de fluoresceína marcados con los isótopos de mercurio Hg^{197} y Hg^{203} , los cuales derivados son apropiados para la aplicación clínica, mas particularmente para diagnosticar tejidos somáticos modificados químicamente. Como materiales de partida para la preparación de dichos compuestos hidroximercurizados, se han empleado usualmente algunos derivados de fluoresceína comerciales que contienen además algunas otras componentes de mezcla usuales, que provocan la contaminación de los preparados hidroximercurizados con un cierto número de subproductos indeseables. Aparte de esto, la reacción de mercurización por si misma se desarrolla no solo hasta la primera etapa, sino incluso hasta la segunda etapa en cierta extensión, el cual hecho puede resultar un manantial de subproductos adicionales. Estos últimos no pueden ser separados prácticamente en procedimientos convencionales de cristalización, especialmente si se utilizan preparados radioactivos, que tienen una alta actividad específica, en cantidades de partida muy pequeñas, que ascienden usualmente a solamente varias decenas de miligramos. Los antedichos componentes de mezcla, especialmente un residuo de mercurio combinado iónicamente, que no ha reaccionado, puede provocar una toxicidad variable en el producto final, la cual propiedad ha sido descrita en conexión con un preparado farmacéutico comercial "Mercurocromo" utiliza-



do en el pasado. /J.H.Burn, G.K.Ephiok, Quart.J.Pharm.Pharmacol. 3, 177 - 1930; M.A.Kitchell: Quart.J.Pharm.Pharmacol. 4, 320 - 1931; R.Wien, G.E.Philips: Quart.J.Pharm.Pharmacol. 18, - 1945; M.A.Gohar: J.Roy.Egyptian Med.Assoc. 26,
5 175 - 1943/. Sin embargo, para la aplicación clínica y para el estudio de la estabilidad frente a la radiación es necesario tener aplicado el preparado en forma pura y químicamente analizable, si es posible.

Además, es bien conocido que algunos autores japoneses han intentado dividir el preparado comercial "Mercurrocromo" analíticamente sobre una columna de gel de hidróxido de aluminio secado, en que ellos han dividido la muestra sobre la columna lavando con piridina, en forma de una serie de zonas coloreadas que ellos han disuelto separadamente con una solución de hidróxido de sodio para formar varias soluciones que contienen, además del respectivo derivado, una gran cantidad de iones aluminato y sodio. Dichas soluciones han sido examinadas polarográficamente. /Y.Nagase, M.Iguchi, Y.Iguchi: J. Pharm.Soc.Japan, 77, 837-1957/.
10 Sin embargo el método antes mencionado no es apropiado para la purificación preparativa de preparados radioactivos proyectados para aplicación clínica ya que, desde el punto de vista experimental, es bastante laborioso, y las soluciones obtenidas de dicha manera contienen una gran cantidad de iones aluminato y sodio, aparte de piridina; estos
15 componentes de mezcla deberán ser separados del preparado.

Con el fin de eliminar o al menos mitigar las desventajas antes mencionadas de la técnica anterior, se crea un método de preparar derivados de la serie de fluoresceína marcados con isótopos radioactivos de mercurio según la
20
25
30



memoria de la patente española 345.345, que comprende, de acuerdo con el invento, someter a una mezcla de reacción cruda o neutralizada a un procedimiento de cromatografía sobre una columna de óxido de aluminio, y lavar la columna sucesivamente con agua y con una solución acuosa diluída de álcali que tiene un valor de pH desde 7 a 14.- En calidad de solución acuosa diluída de álcali se utiliza una solución de bicarbonato, carbonato o hidróxido de metal alcalino, preferiblemente de sodio. El procedimiento de cromatografía se lleva a cabo sobre una columna de óxido de aluminio neutro.

De acuerdo con el presente invento es posible separar, desde el producto deseado, tanto los compuestos de partida que no han reaccionado, es decir el derivado de fluoresceína así como el mercurio radioactivo combinado iónicamente, como los otros subproductos que se originan en la reacción, de una manera fácil, sobre una columna de óxido de aluminio en un medio alcalino. En lo que concierne a los compuestos, que son particularmente insolubles en los disolventes orgánicos convencionales que se utilizan en procedimientos cromatográficos sobre columna de Al_2O_3 , éstos son divididos en forma de sales alcalinas disueltas en un medio acuoso separandolas de la columna de Al_2O_3 neutro por lavado con agua, soluciones diluídas de bicarbonato, carbonatos ó hidróxidos de metales alcalinos, preferiblemente hidróxido de sodio. La división es facilitada en un grado considerable por el hecho de que el mercurio incoloro combinado iónicamente es eluido en la fracción acuosa frontal, mientras que todos los otros derivados son visibles en la columna en forma de zonas rojas de diversos tonos.



4.8.68

Otra ventaja del método de acuerdo con el presente invento consiste en que los derivados de fluoresceína que no han reaccionado (es decir no mercurizados), son lavados, después que el mercurio combinado iónicamente en las siguientes fracciones, solo con agua, mientras que el derivado monohidroxi-mercurizado que está adsorbido mucho más fuertemente sobre el óxido de aluminio, ha de ser separado por lavado por medio de una solución de bicarbonato o de carbonato. Los derivados mercúricos antes mencionados son adsorbidos sobre la columna de forma muy fuerte de manera que solo pueden ser separados por lavado con hidróxido de sodio. La gran selectividad antes mencionada de adherencia de adsorción de los constituyentes particulares de la mezcla de reacción hace posible que incluso muy pequeñas cantidades ponderales (por ejemplo desde decenas hasta cientos de miligramos) que tienen altas actividades específicas (es decir hasta cientos de mc), tal como se utilizan en la práctica, sean divididas con mucha facilidad y sencillez. De la manera fácil antes indicada, se obtiene el deseado producto químicamente puro en solución, el cual, después de una modificación del valor de pH y de esterilización, está dispuesto para la aplicación clínica. Con fines de almacenamiento, es posible aislar el producto acidificando la solución después de precipitación, por una simple filtración. A título de ejemplo, se purificaron cromatográficamente los siguientes derivados:

Hidroximercurifluoresceína-Hg¹⁹⁷ ó -Hg²⁰³; Hidroximercuri-2', 7'-dibromofluoresceína-Hg¹⁹⁷ ó -Hg²⁰³; Hidroximercuri-4', 5'-dibromofluoresceína-Hg¹⁹⁷ ó -Hg²⁰³; Hidroximercuri-2', 7'-diyodofluoresceína-Hg¹⁹⁷ ó -Hg²⁰³ y bis(hidro-



ximercuri)-fluoresceina-Hg¹⁹⁷ 6 Hg²⁰³.

Con el fin de que el invento pueda ser mejor com
prendido y llevado a la práctica, se describirán ahora los
siguientes ejemplos, que no se pretende que lo definan ni
5 lo limiten.

Ejemplo 1.- Una mezcla de reacción obtenida ca
lentando un equivalente de Hg²⁰³ (22 miligramos, 0,1 mili
moles) que tiene una actividad específica de 10 mc/mmol,
juntamente con tres equivalentes de una sal de sodio de
10 fluoresceina (100 miligramos, 0,3 milimoles) en 2 milili
tros de agua acidificada con 30 miligramos de ácido acéti
co, fué neutralizada con una solución acuosa diluída de
hidróxido de sodio y fué vertida en este estado sobre 5
gramos de Al₂O₃, después de lo cual esto fué lavado con
15 agua destilada. En la primera fracción, que ascendía a
5 mililitros, se separó por lavado todo el residuo del mer
curio radioactivo combinado iónicamente, mientras que en
las fracciones segunda y tercera, cada una de 5 mililitros,
fueron eluidas las porciones de fluoresceina que no había
reaccionado. En la cuarta fracción, de 7 mililitros, se
20 eluyó difluoresceinilmercuri-Hg²⁰³ que tenía 55% de radio
actividad. En las fracciones quinta y sexta, cada una de
4 mililitros de solución de carbonato de sodio 0,1 N, se
eluyeron otras dos porciones de hidroximercurifluorescei
25 na y las fluoresceinas mercurizadas antes mencionadas, que
constituyen subproductos de la reacción, que tenían 30%
de radioactividad. El residuo, es decir de aproximadamen
te 15% de radioactividad, quedó sobre la columna en forma
de los subproductos de la reacción. La fracción que con
30 tenía difluoresceinilmercuri-Hg²⁰³, después de una neutra-



lización previa (modificación del valor del pH) y de esterilización, estaba dispuesta para la aplicación clínica directa.

5 Ejemplo 2.- La mezcla de reacción fué dividida de la misma manera que se indica en el ejemplo 1, excepto que, en lugar de Hg^{203} , se utilizó Hg^{197} . El rendimiento de hidroximercurifluoresceina- Hg^{197} fué similar al descrito en el ejemplo 1.

10 Ejemplo 3.- La mezcla de reacción fué dividida de la misma manera que se indica en el ejemplo 1, excepto que en lugar de solución 0,1 N de Na_2CO_3 se utilizó solución 0,1 N de bicarbonato de sodio en calidad de eluyente. El rendimiento fué análogo al descrito en el ejemplo 1.

15 Ejemplo 4.- La mezcla de reacción fué preparada de la misma manera que se indica en el ejemplo 1, excepto que en lugar de fluoresceina se utilizó una cantidad equivalente de 2', 7'-dibromofluoresceina (cromatográficamente pura); la mezcla fué dividida de la misma manera que se describe en el ejemplo 1. El rendimiento de hidroximercuri-2', 7'-dibromofluoresceina- Hg^{203} ascendió a 40%.

20 Ejemplo 5.- La mezcla de reacción fué dividida de la misma manera que se indica en el ejemplo 4, excepto que, en lugar de isótopo de mercurio Hg^{203} , se utilizó Hg^{197} . El rendimiento de hidroximercuri-2', 7'-dibromofluoresceina- Hg^{197} fué análogo al indicado en el ejemplo 4.

25 Ejemplo 6.- La mezcla de reacción fué preparada de la misma manera que se describe en el ejemplo 4, con la excepción de que, en lugar de 2', 7'-dibromofluoresceina, se utilizó 4', 5'-dibromofluoresceina. La mezcla fué dividida de la misma manera que se describe en el ejemplo 1.



El rendimiento de hidroximercuri-4', 5'-dibromofluoresceina-Hg²⁰³ fué de 41%.

5 Ejemplo 7.- La mezcla de reacción fué dividida de la misma manera que se indica en el ejemplo 6, excepto que en lugar de isótopo de mercurio Hg²⁰³ se utilizó Hg¹⁹⁷. El rendimiento de hidroximercuri-4', 5'-dibromofluoresceina-Hg¹⁹⁷ fué similar al indicado en el ejemplo 6.

10 Ejemplo 8.- La mezcla de reacción fué preparada de la misma manera que se describe en el ejemplo 6, con la excepción de que, en lugar de 4', 5'-dibromofluoresceina, se utilizó 2', 7'-diyodofluoresceina. La mezcla de reacción fué dividida de la misma manera que se indica en el ejemplo 6. El rendimiento de hidroximercuri-2', 7'-diyodofluoresceina-Hg²⁰³ ascendió a 39%.

15 Ejemplo 9.- La mezcla de reacción fué dividida de la misma manera que se indica en el ejemplo 3 excepto que, en lugar de solución 0,1 N de bicarbonato de sodio se utilizó solución 0,1 N de bicarbonato de potasio y, en lugar de solución 0,1 N de hidróxido de sodio, se utilizó
20 solución 0,1 N de hidróxido de potasio. El rendimiento fué de aproximadamente 40%.

25 Ejemplo 10.- La mezcla de reacción fué dividida tal como se describe en el ejemplo 9 con la excepción de que, en lugar de solución 0,1 N de bicarbonato de potasio se utilizó solución 0,1 N de carbonato de potasio. El rendimiento fué nuevamente de aproximadamente 40%.

30 Ejemplo 11.- La mezcla de reacción fué dividida tal como se describe en el ejemplo 8, excepto que, en lugar de isótopo de mercurio Hg²⁰³, se utilizó Hg¹⁹⁷. El rendimiento de hidroximercuri-2', 7'-diyodofluoresceina-Hg¹⁹⁷



ascendió a 37%.

Ejemplo 12.- La mezcla de reacción obtenida poniendo a ebullición durante media hora dos equivalentes de Hg^{203}O (3,4 miligramos, 0,2 milimoles) que tenían una actividad específica de 10 mc/mmol., juntamente con un equivalente de fluoresceína (33 miligramos, 0,1 mmol.) en 2 mililitros de agua acidificada con 30 miligramos de ácido acético, fué cromatografiada de la misma manera que se indica en el ejemplo 1. En las fracciones de una solución acuosa diluída de hidróxido de sodio se aisló 60% de bis-(hidroximercuri-fluoresceína- Hg^{203}).

Ejemplo 13.- La mezcla de reacción fué dividida de la misma manera que se indica en el ejemplo 12, excepto que en lugar del isótopo de mercurio Hg^{203} , se utilizó Hg^{197} . El rendimiento ascendió a 61% de bis-(hidroximercuri)fluoresceína- Hg^{197} .

Los derivados individuales purificados en los procedimientos antes mencionados fueron sometidos a ensayos de toxicidad, y ofrecieron resultados comparables. Además, fueron sometidos al ensayo de análisis sobre un músculo roto de una rata de ensayo en el cual se examinaron sus poderes de acumulación en el músculo dañado así como sus índices RI (es decir la proporción de la cantidad de la respectiva sustancia acumulada en 1 gramo del músculo dañado a la cantidad de la misma en 1 gramo del músculo normal) y los índices RII (es decir la proporción de la cantidad de la respectiva sustancia acumulada en 1 gramo del músculo dañado a la cantidad de la misma en 1 mililitro de sangre); similarmente, los ensayos antedichos ofrecieron resultados comparables.



Además, estos preparados purificados cromatográficamente fueron utilizados para examinar infartos de miocardio de perro simulados, tanto "in vivo" como "in vitro", los cuales experimentos mostraron resultados positivos en todos los casos.

La presente solicitud que corresponde a la presentada en Checoslovaquia, con fecha 12 de Julio de 1967, bajo el número PV 5116-67 se acoge a los beneficios del Artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

N O T A

Los puntos de invención propia y nueva, que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Certificado de Adición en España, son los siguientes:

1.- Mejoras introducidas en el objeto de la patente principal nº 345.345, solicitada el 22 de Septiembre de 1.967, por "Un procedimiento para la producción de derivados de la serie de la fluorenceina" marcados con isótopos radioactivos de mercurio caracterizados porque comprenden someter a una mezcla de reacción cruda o neutralizada a un procedimiento de cromatografía sobre una columna de óxido de aluminio.

4.8.68



2.- Mejoras según la reivindicación 1, en las que la columna es lavada sucesivamente con agua y con una solución acuosa diluída de álcali que tiene un valor de pH de 7 a 14.

5 3.- Mejoras según las reivindicaciones 1 y 2, en las que en calidad de solución acuosa diluída de álcali se utiliza una solución de bicarbonato, carbonato o hidróxido de un metal alcalino, preferiblemente sodio.

10 4.- Mejoras según una cualquiera de las precedentes reivindicaciones 1 a 3, en las que el procedimiento de cromatografía se lleva a cabo sobre una columna de óxido de aluminio neutro.

15 5.- "Mejoras introducidas en el objeto de la Patente Principal nº 345.345, solicitada el 22 de Septiembre de 1.967, por : "Un procedimiento para la producción de derivados de la serie de la fluoresceína".

Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede y para los fines que se han especificado.

20 La presente Memoria consta de 11 hojas escritas a máquina por una sola de sus caras.

Madrid, 14 AGO 1968

P.A.