

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **236172**
(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **415771**

(22) Data zgłoszenia: **12.01.2016**

(51) Int.Cl.
A61K 51/00 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61K 31/473 (2006.01)

(54) **Radiofarmaceutyk diagnostyczny do obrazowania poziomu cholinesteraz,
sposób jego wytwarzania oraz jego zastosowanie**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
17.07.2017 BUP 15/17

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
14.12.2020 WUP 20/20

(73) Uprawniony z patentu:

**INSTYTUT CHEMII I TECHNIKI JĄDROWEJ,
Warszawa, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

EWA GNIAZDOWSKA, Warszawa, PL
PRZEMYSŁAW KOŹMIŃSKI, Warszawa, PL
ELŻBIETA MIKICIUK-OLASIK, Łódź, PL
PAWEŁ SZYMAŃSKI, Branice, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Anna Bełz

PL 236172 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest receptorowy radiofarmaceutyk diagnostyczny posiadający powinowactwo do acetylocholinoesterazy, oparty na pochodnej takryny, sposób jego wytwarzania oraz jego zastosowanie.

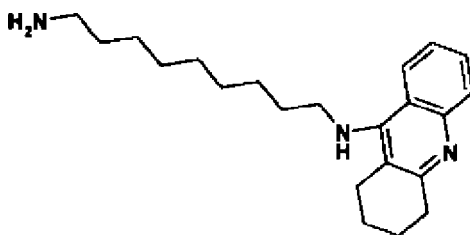
Otrzymywanie radiofarmaceutyku według wynalazku polega na zaprojektowaniu połączeń ligandu Hynic (hydrazinonicotinamide, amid kwasu hydrazynonikotynowego) i/lub sfunkcjonalizowanych makrocyklicznych ligandów: DOTA (1,4,7,10-tetraazacyklododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid, kwas 1,4,7,10-tetraazacyklododekano-1,4,7,10-tetraoctowy), DOTAGA (1,4,7,10-tetraazacyklododecane-1-(glutaric acid)-4,7,10-triacetic acid, kwas 1,4,7,10-tetraazacyklododekano-1-,glutarowo-4,7,10-tetraoctowy), NOTA (1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacetic acid, kwas 1,4,7-triazacyclononano-trioctowy) i NODAGA (1,4,7-triazacyclononane,(1-glutaric acid)-4,7-acetic acid, kwas 1,4,7-triazacyclononano-1-glutarowo-4,7-octowy) z cząsteczką pochodnej takryny w sposób niezmieniający jej właściwości biologicznych. Otrzymany preparat Hynic-pochodna takryny po wyznakowaniu technetem-99m, i/lub preparat DOTA-pochodna takryny, i/lub DOTAGA-pochodna takryny i/lub NOTA-pochodna takryny, i/lub NODAGA-pochodna takryny po wyznakowaniu radionuklidem diagnostycznym tworzącym kompleksy z ligandami DOTA, DOTAGA, NOTA i NODAGA, wybranym z grupy obejmującej gal-68, skand-43, skand-44, służy do obrazowania podwyższonego poziomu acetylocholinoesterazy, występującego w przypadku choroby Alzheimera w obszarach mózgu, w których wystąpiła neurodegeneracja.

Takryna – związek wykorzystywany w leczeniu choroby Alzheimera – jest inhibitorem enzymu acetylocholinesterazy rozkładającym acetylocholinę do choline i kwasu octowego. Takryna hamuje aktywność acetylocholinoesterazy i w ten sposób powoduje zwiększenie się ilości wolnej acetylocholine w szczelinie synaptycznej. Towarzyszy temu wzrost przekąźnictwa w układzie cholinergicznym ośrodkowego układu nerwowego (OUN), co zmniejsza objawy otępienia występujące w chorobie Alzheimera. Stosowana pochodna takryny to związek N-(1,2,3,4-tetrahydroakrydyno-9-yl)nonan-1,9-diamina, (**Tac(9)**), posiadający w cząsteczce łańcuch węglowodorowy (zawierający 9 grup CH₂) zakończony l-rzędową grupą aminową, jak przedstawiono we **wzorze 6**, która nie bierze udziału w oddziaływaniu biologicznym z cholinoesterazami.

Znana jest w stanie techniki z Fizyki Medycznej, ZFBM: studia II stopnia, Tematy prac magisterskich w roku akademickim 2014/2015, pkt 6, dr Ewa Gniazdowska (ICHTJ) „Synteza i badanie radio-biokoniugatu ⁶⁸Ga-pochodna takryny dla diagnostyki PET w chorobie Alzheimera” pochodna takryny.

W publikacji Aleksandra Bilewicza i współpr. „Badania chemiczne w Instytucie Chemii i Techniki Jądrowej nad projektowaniem i syntezą nowych radiofarmaceutyków” ujawniono także takrynę i jej działanie w leczeniu choroby Alzheimera.

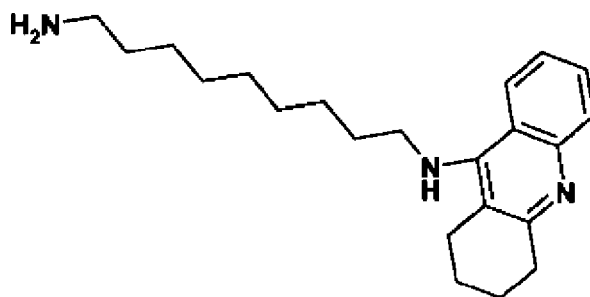
Pochodna takryny N-(1,2,3,4-tetrahydroakrydyno-9-yl)nonan-1,9-diamina, (**Tac(9)**) znana jest także z publikacji Pawła Szymańskiego i współpr. “Synthesis and biological activity of derivatives of tetrahydroacridine as acetylcholinesterase inhibitors”.



wzór 6

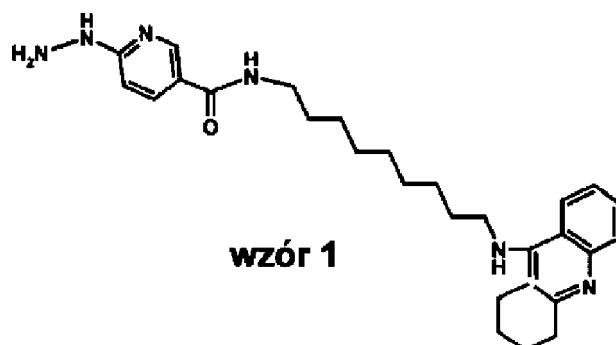
Nieoczekiwanie, okazało się, iż koniugaty ligandu Hynic i/lub makrocyklicznych ligandów DOTA, DOTAGA, NOTA i NODAGA z cząsteczką pochodnej takryny po wyznakowaniu odpowiednim radionuklidem diagnostycznym, przy wprowadzeniu do organizmu pełnią rolę sondy diagnostycznej w wyniku kumulowania się w miejscach, gdzie znajdują się cholinoesterazy (głównie w ośrodkowym układzie nerwowym, a także w wątrobie i jelitach). Dzięki temu możliwe jest określenie poziomu neuroprzekąźnika, a tym samym określenie rejonu w mózgu, w którym doszło do neurodegeneracji. Acetylocholinoesteraza występuje także w wątrobie i jelitach, a więc otrzymane preparaty mogą być markarami do określania stanu fizjologicznego tych narządów.

Diagnostyczny radiofarmaceutyk do obrazowania poziomu cholinioesteraz, który stanowi pochodną takryny, o wzorze 6,

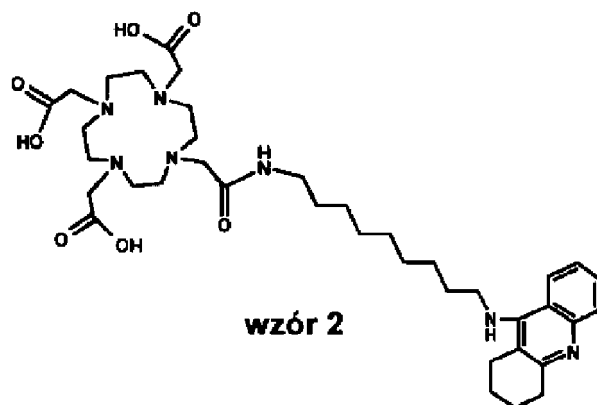


wzór 6

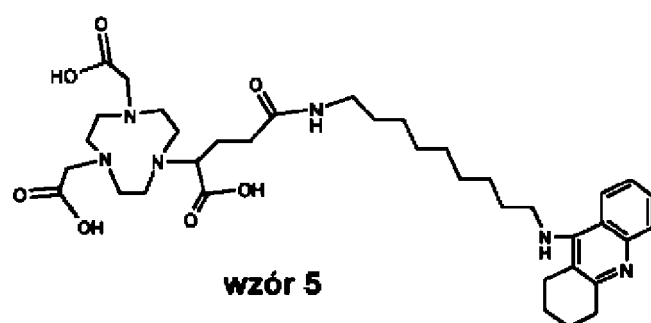
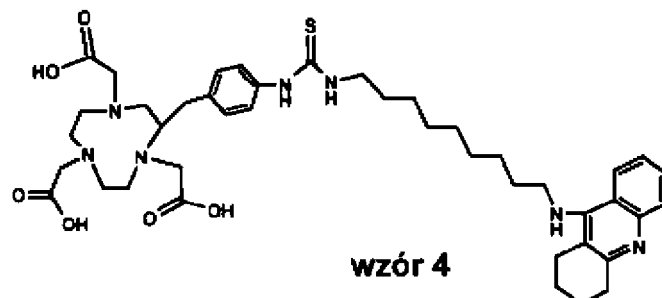
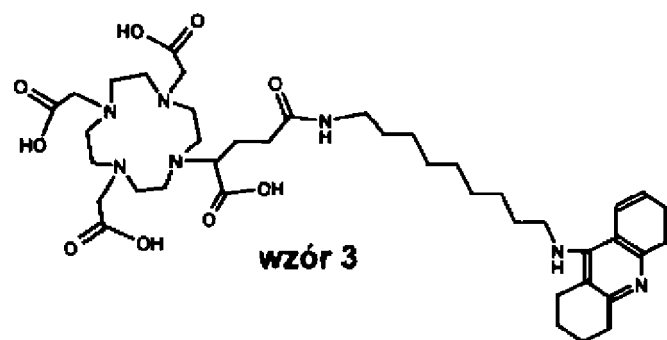
charakteryzuje się tym, że jest ona przyłączona do ligandu amidu kwasu hydrazynonikotynowego (Hynic) lub do makrocyclicznego ligandu kwasu 1,4,7,10-tetraazacyklododekano-1,4,7,10-tetraoctowego (DOTA), kwasu 1,4,7,10-tetraazacyklododekano-1,-glutarowo-4,7,10-tetraoctowego (DOTAGA), kwasu 1,4,7-triazacyklononano-trioctowego (NOTA) lub kwasu 1,4,7-triazacyclononano-1-glutarowo-4,7-octowego (NODAGA), wiązaniem amidowym pomiędzy grupą karboksylową ligandu bezpośrednio lub po sfunkcjonalizowaniu jej grupą NHS, lub wiązaniem tioamidowym pomiędzy wcześniej wprowadzoną do cząsteczki używanego ligandu grupą funkcyjną izotiocyanianu fenylu (SCN), a w przypadku ligandów kwasu 1,4,7,10-tetraazacyklododekano-1,-glutarowo-4,7,10-tetraoctowego (DOTAGA) i kwasu 1,4,7-triazacyclononano-1-glutarowo-4,7-octowego (NODAGA) także przy użyciu bezwodników kwasu 1,4,7,10-tetraazacyklododekano-1,-glutarowo-4,7,10-tetraoctowego (DOTAGA) bezwodnik i kwasu 1,4,7-triazacyclononano-1-glutarowo-4,7-octowego (NODAGA), a I-rzędową grupą aminową położoną na końcu łańcucha węglowodorowego pochodnej takryny, jak przedstawiono we wzorach 1, 2, 3, 4 i 5,



wzór 1

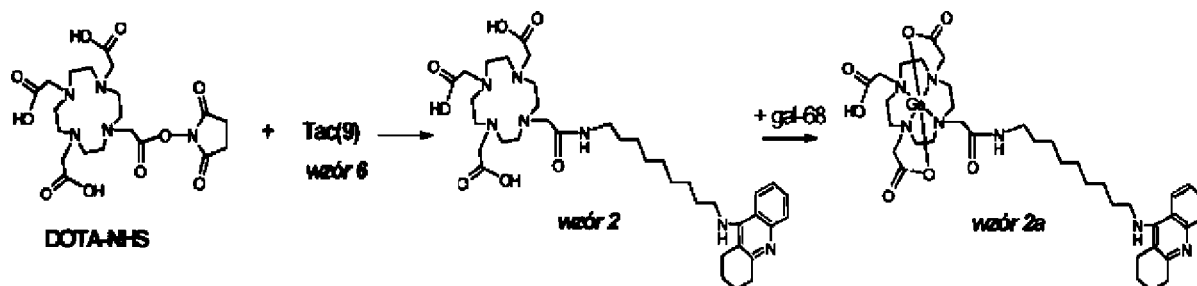


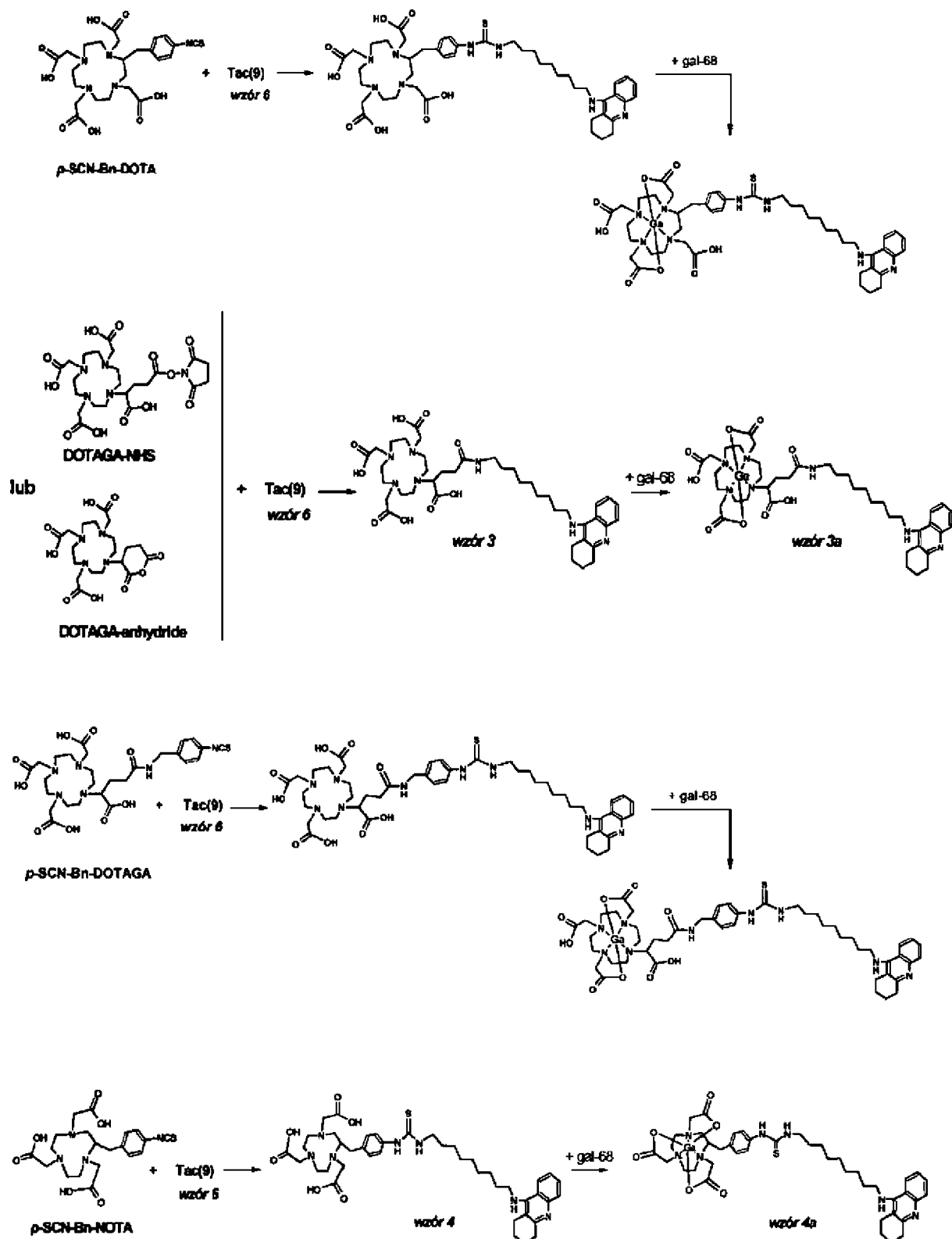
wzór 2

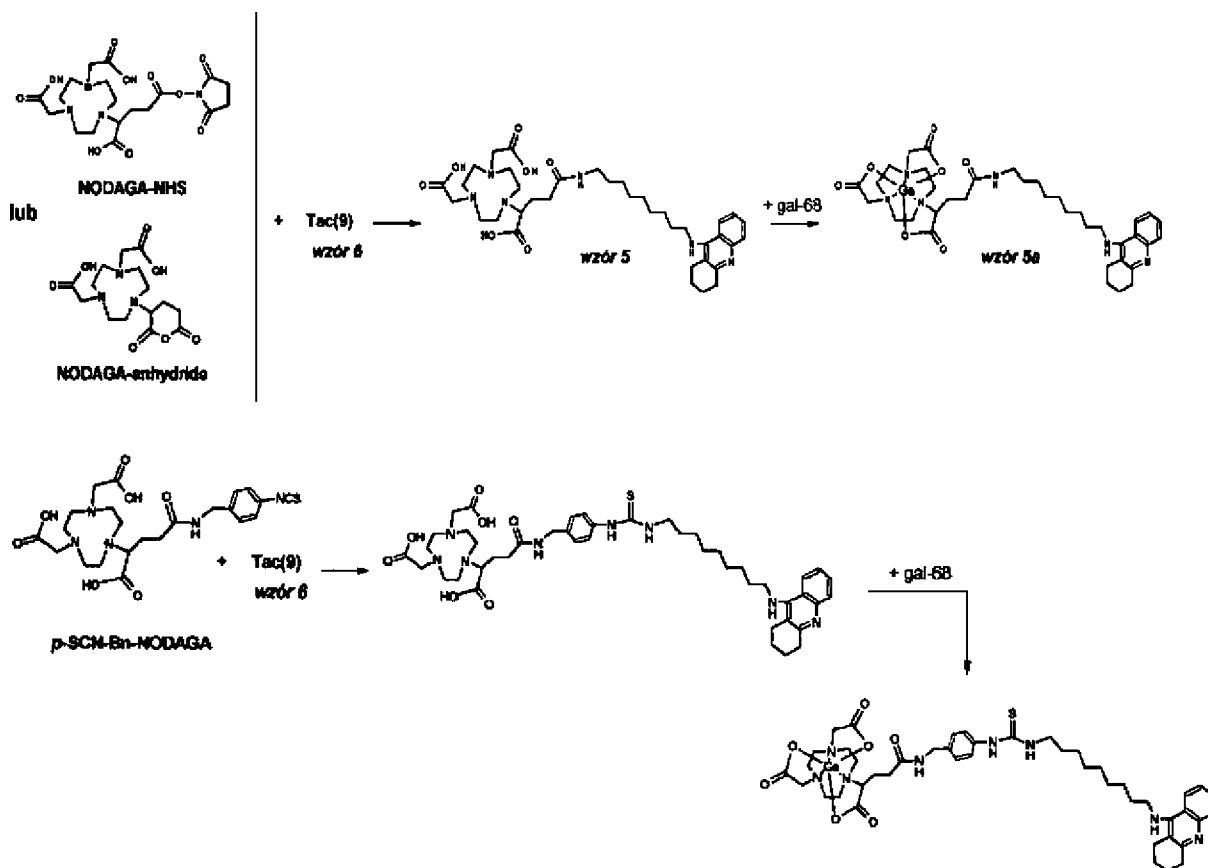


wyznakowany technetem-99m w przypadku ligandu Hynic lub radionuklidem diagnostycznym tworzącym kompleksy z ligandem DOTA, DOTAGA, NOTA lub NODAGA, wybranym z grupy obejmującej gal-68, skand-43 lub skand-44.

Zamieszczone poniżej schematy przedstawiają przykładowo wybrane reakcje otrzymywania koniugatów ligand-pochodna takryny przy użyciu sfunkcjonalizowanych makrocyklicznych ligandów DOTA, DOTAGA, NOTA i NODAGA.







Nieoczekiwanie, okazało się, iż przyłączenie makrocyklicznego ligandu Hynic, DOTA, DOTAGA, NOTA lub NODAGA do pochodnej takryny poprzez atom azotu I-rzędowej grupy aminowej cząsteczki takryny nie zmienia jej aktywności biologicznej względem cholinoesteraz.

Sposób wytwarzania diagnostycznego radiofarmaceutyku do obrazowania poziomu cholinoesteraz, opartego na pochodnej takryny oraz diagnostycznym radionuklidzie, według wynalazku, polega na tym, że do cząsteczki pochodnej takryny przyłącza się chelator amidu kwasu hydrazynonikotynowego (Hynic) lub makrocykliczny ligand kwasu 1,4,7,10-tetraazacyklododekano-1,4,7,10-tetraoctowego (DOTA), kwasu 1,4,7,10-tetraazacyklododekano-1,-glutarowo-4,7,10-tetraoctowego (DOTAGA), kwasu 1,4,7-triazacyklononano-trioctowego (NOTA) lub kwasu 1,4,7-triazacyklononano-1-glutarowo-4,7-octowego (NODAGA) poprzez atom azotu z I-rzędowej grupy aminowej położonej na końcu łańcucha węglowodorowego Tac(9), w taki sposób, że roztwór pochodnej takryny rozpuszczony w bezwodnym rozpuszczalniku organicznym, wybranym z grupy obejmującej N,N-dimetyloformamid (DMF), dimetylosulfotlenek (DMSO), acetonitryl, miesza się z roztworem chelatora Hynic, DOTA, DOTAGA, NOTA lub NODAGA, w tym samym rozpuszczalniku, a do mieszaniny reakcyjnej dodaje się kilkakrotny nadmiar trietyloaminy (Et₃N), całość wysyca azotem i miesza mieszałem magnetycznym w temperaturze 50°C–60°C przez okres 24 godzin, przy czym postęp reakcji kontroluje się metodą HPLC, aż do uzyskania koniugatu ligandu Hynic lub makrocyklicznego ligandu DOTA, DOTAGA, NOTA lub NODAGA z cząsteczką pochodnej takryny, co potwierdzono analizą spektrometrii mas (MS), z wydajnością reakcji rzędu 78–93%, po czym uzyskany koniugat Hynic-Tac(9), DOTA-Tac(9), DOTAGA-Tac(9), NOTA-Tac(9) lub NODAGA-Tac(9) znakuje się radionuklidem technetem-99m w przypadku koniugatu Hynic-Tac(9), lub radionuklidem diagnostycznym tworzącym kompleksy z ligandem DOTA, DOTAGA, NOTA lub NODAGA, wybranym z grupy obejmującej gal-68, skand-43 lub skand-44, zgodnie ze znaną procedurą, w przypadku koniugatów Hynic-Tac(9), DOTA-Tac(9), DOTAGA-Tac(9) ogrzewanie w temperaturze 85°C–90°C przez 25 min, w przypadku koniugatów NOTA-Tac(9) i NODAGA-Tac(9) w temperaturze pokojowej przez 10 min, a następnie wyizolowuje się z mieszaniny reakcyjnej dany radiobiokoniugat przy użyciu półpreparatywnej metody wysokoprężnej chromatografii cieczowej (HPLC).

W sposobie według wynalazku, korzystnie roztwór pochodnej takryny rozpuszczonej w bezwodnym rozpuszczalniku organicznym miesza się z roztworem chelatora bezpośrednio, lub po wcześniejszym wprowadzeniu do cząsteczki chelatora grupy funkcyjnej NHS lub SCN, a w przypadku ligandów DOTAGA i NODAGA także przy użyciu bezwodników DOTAGA-bezwodnik i NODAGA-bezwodnik, rozpuszczonych w tym samym rozpuszczalniku.

Zastosowanie radiofarmaceutyku diagnostycznego, według wynalazku, do obrazowania podwyższonego poziomu acetylocholinoesterazy występującego w stanach chorobowych wątroby i jelit, a zwłaszcza w obszarach mózgu, w których na skutek choroby Alzheimera doszło do neurodegeneracji.

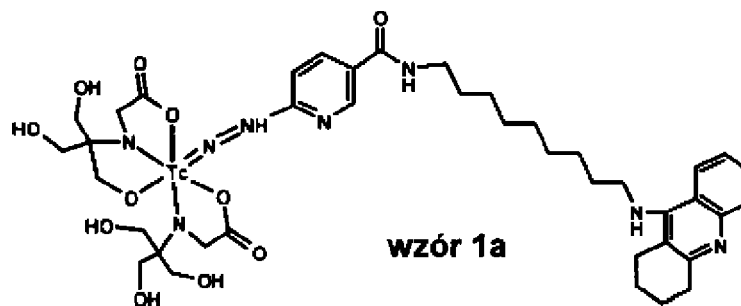
Wyizolowane z mieszaniny reakcyjnej radiobiokoniugaty wykazują niezmienną aktywność biologiczną do cholinoesteraz, porównywalną z aktywnością biologiczną takryny.

Przedmiot wynalazku zilustrowano w podanych niżej przykładach.

Przykład I

W probówce eppendorfa do roztworu 0,55 mg ($1,63 \cdot 10^{-3}$ mmola) Tac(9) rozpuszczonej w 100 μ L acetonitrylu dodano 0,6 mg ($2,1 \cdot 10^{-3}$ mmola) ligandu Hynic-NHS rozpuszczonego również w 100 μ L acetonitrylu oraz 1,15 μ L ($8,22 \cdot 10^{-3}$ mmola) Et₃N. Mieszaninę reakcyjną wysycono argonem i pozostawiono w temperaturze 55°C, na mieszadle magnetycznym na okres 24 h. Postęp reakcji kontrolowano za pomocą metody HPLC. Produktem reakcji był koniugat ligandu Hynic z cząsteczką Tac(9), Hynic-Tac(9), (wydajność reakcji była rzędu 80%), co zostało potwierdzone analizą MS. Ligand Hynic został przyłączony do cząsteczki Tac(9) poprzez atom azotu I-rzędowej grupy aminowej położonej na końcu łańcucha węglowodorowego cząsteczki pochodnej takryny.

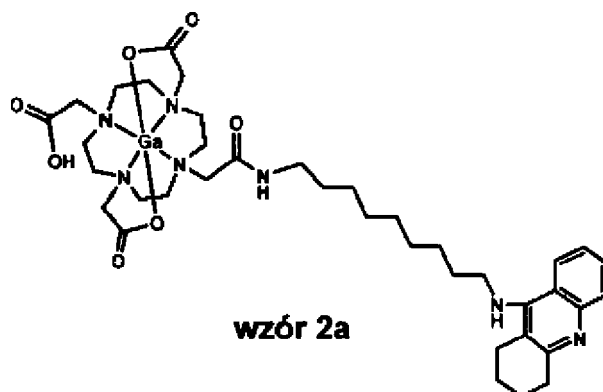
Proces znakowania koniugatu Hynic-Tac(9) radionuklidem technet-99m przeprowadzono zgodnie ze znaną już procedurą (w obecności 20 mg trycyny, 5 mg EDDA, 80 μ g SnCl₂ i eluatu z generatora ⁹⁹Mo/^{99m}Tc, ogrzewanie w temp. 90°C przez 25 min), a następnie stosując wyizolowany (przy użyciu półpreparatywnej metody HPLC) z mieszaniny reakcyjnej radiobiokoniugat [^{99m}Tc]Tc-Hynic-Tac(9), (wzór 1a), zbadano jego aktywność biologiczną względem enzymów acetylocholinoesterazy i butylocholinoesterazy. Wyniki badań wykazały aktywność biologiczną radiobiokoniugatu porównywalną z aktywnością biologiczną takryny.



Przykład II

W probówce eppendorf do roztworu 0,38 mg ($1,12 \cdot 10^{-3}$ mmola) Tac(9) rozpuszczonej w 100 μ L DMF wlało roztwór 1,30 mg ($1,71 \cdot 10^{-3}$ mmola) chelatora DOTA-NHS rozpuszczonego również w 100 μ L DMF. Do mieszaniny reakcyjnej dodano 0,67 μ L ($4,78 \cdot 10^{-3}$ mmola) Et₃N, całość wysycono azotem i pozostawiono na mieszadle magnetycznym w temperaturze 50°C przez okres 24 godzin. Postęp reakcji kontrolowano za pomocą metody HPLC. Produktem reakcji był koniugat makrocyklicznego ligandu DOTA z cząsteczką Tac(9), DOTA-Tac(9), (wydajność reakcji była rzędu 80%), co zostało potwierdzone analizą MS. Makrocykliczny ligand DOTA został przyłączony do cząsteczki Tac(9) poprzez atom azotu I-rzędowej grupy aminowej położonej na końcu łańcucha węglowodorowego cząsteczki pochodnej takryny.

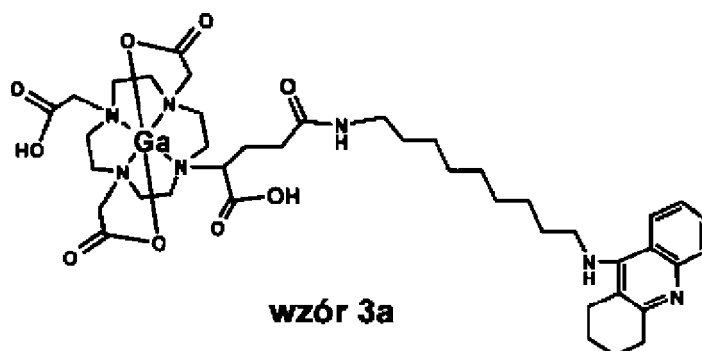
Proces znakowania koniugatu makrocyklicznego ligandu DOTA z cząsteczką Tac(9) radionuklidem gal-68 przeprowadzono zgodnie ze znaną już procedurą (ogrzewanie w temp. 90°C przez 25 min), a następnie radiobiokoniugat [⁶⁸Ga]Ga-DOTA-Tac(9), (wzór 2a), wyizolowano z mieszaniny reakcyjnej stosując półpreparatywną metodę HPLC. Stosując 'zimny' związek referencyjny Ga-DOTA-Tac(9) zbadano jego aktywność biologiczną względem enzymów acetylocholinoesterazy i butylocholinoesterazy. Wyniki badań wykazały aktywność biologiczną preparatu Ga-DOTA-Tac(9), a więc także radiobiokoniugatu [⁶⁸Ga]Ga-DOTA-Tac(9) porównywalną z aktywnością biologiczną takryny.



Przykład III

Do probówki typu eppendorf zawierającej 1,27 mg ($2,21 \cdot 10^{-3}$ mmola) chelatora DOTAGA-NHS, rozpuszczonego w 120 μL bezwodnego DMF (lub 0,98 mg tj. $2,14 \cdot 10^{-3}$ mmola chelatora DOTAGA-bezwodnik, wlało roztwór 0,88 mg ($2,18 \cdot 10^{-3}$ mmola) Tac(9) rozpuszczonej również w 120 μL DMF oraz, w przypadku użycia chelatora DOTAGA-NHS, 1,3 μL ($9,33 \cdot 10^{-3}$ mmola) Et_3N . Całość wysycono azotem i pozostawiono na mieszadle magnetycznym w temperaturze 50°C przez okres 24 godzin. Postęp reakcji kontrolowano za pomocą metody HPLC. Produktem reakcji był koniugat makrocyklicznego ligandu DOTAGA z cząsteczką Tac(9), DOTAGA-Tac(9), (wydajność reakcji w przypadku użycia chelatora DOTAGA-NHS była rzędu 93%, natomiast w przypadku chelatora DOTAGA-bezwodnik 78%), co zostało potwierdzone analizą MS. Makrocykliczny ligand DOTAGA został przyłączony do cząsteczki Tac(9) poprzez atom azotu I-rzędowej grupy aminowej położonej na końcu łańcucha węglowodorowego cząsteczki pochodnej takryny.

Proces znakowania koniugatu makrocyklicznego ligandu DOTAGA z cząsteczką Tac(9) radionuklidem diagnostycznym gal-68 przeprowadzono zgodnie ze znaną już procedurą (w temperaturze pokojowej przez 25 min), a następnie radiobiokoniugat [^{68}Ga]Ga-DOTAGA-Tac(9), (**wzór 3a**), wyizolowano z mieszaniny reakcyjnej stosując półpreparatywną metodę HPLC.

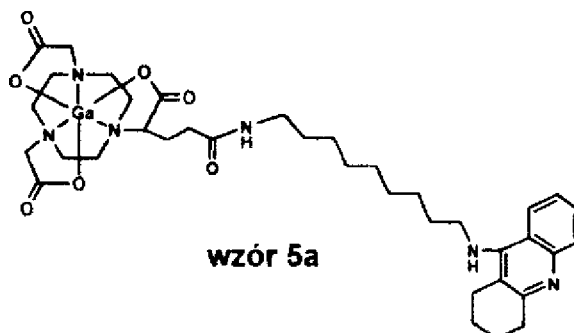


Przykład IV

Do probówki typu eppendorf zawierającej 1,12 mg ($1,54 \cdot 10^{-3}$ mmola) chelatora NODAGA-NHS (lub 0,58 mg tj. $1,62 \cdot 10^{-3}$ mmola chelatora NODAGA-bezwodnik), rozpuszczonego w 110 μL bezwodnego DMSO, wlało roztwór 0,78 mg ($1,93 \cdot 10^{-3}$ mmola) Tac(9) rozpuszczonej również w 110 μL DMSO oraz, w przypadku użycia chelatora NODAGA-NHS, 1,3 μL ($9,33 \cdot 10^{-3}$ mmola) Et_3N . Całość wysycono azotem i pozostawiono na mieszadle magnetycznym w temperaturze 50°C przez okres 24 godzin. Postęp reakcji kontrolowano za pomocą metody HPLC. Produktem reakcji był koniugat makrocyklicznego ligandu NODAGA z cząsteczką Tac(9), NODAGA-Tac(9), (wydajność reakcji w przypadku użycia chelatora NODAGA-NHS była rzędu 90%, natomiast w przypadku chelatora NODAGA-anhydride 82%), co zostało potwierdzone analizą MS. Makrocykliczny ligand NODAGA został przyłączony do cząsteczki Tac(9) poprzez atom azotu I-rzędowej grupy aminowej położonej na końcu łańcucha węglowodorowego cząsteczki pochodnej takryny.

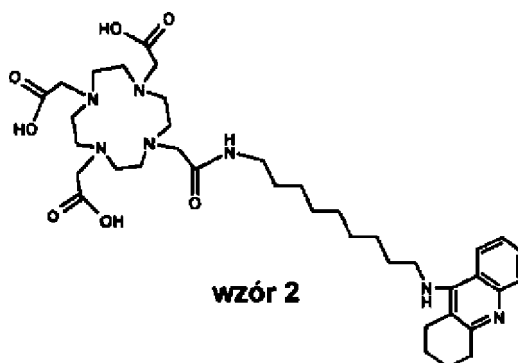
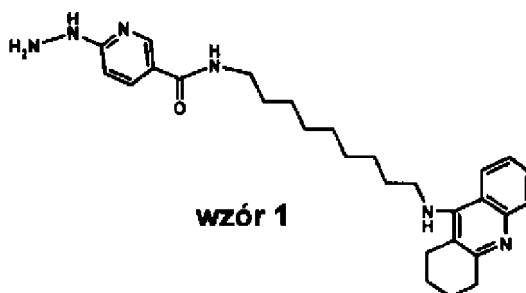
Proces znakowania koniugatu makrocyklicznego ligandu NODAGA z cząsteczką Tac(9) radionuklidem diagnostycznym gal-68 przeprowadzono zgodnie ze znaną już procedurą (w temperaturze pokojowej przez 25 min), a następnie radiobiokoniugat [^{68}Ga]Ga-NODAGA-Tac(9), (**wzór 5a**), wyizolowano z mie-

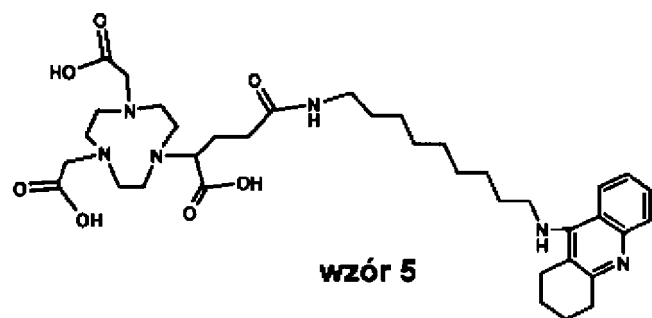
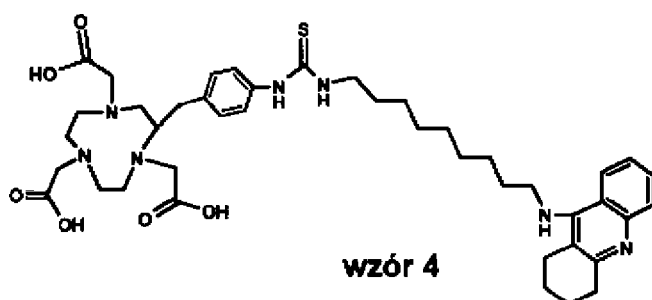
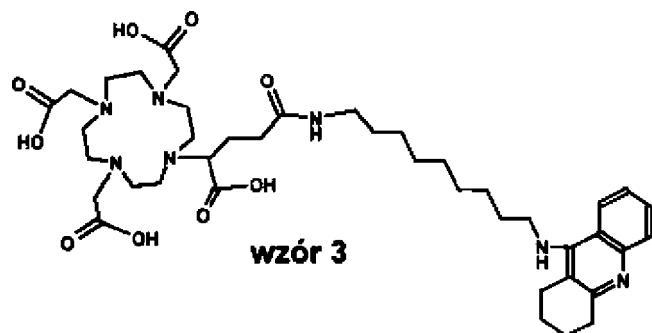
szaniny reakcyjnej stosując półpreparatywną metodę HPLC. Stosując 'zimny' związek referencyjny Ga-NODAGA-Tac(9) zbadano jego aktywność biologiczną względem enzymów acetylocholinoesterazy i butylocholinoesterazy. Wyniki badań wykazały aktywność biologiczną preparatu Ga-NODAGA-Tac(9) (a więc także radiobiokoniugatu [^{68}Ga]Ga-NODAGA-Tac(9) porównywalną z aktywnością biologiczną takryny.



Zastrzeżenia patentowe

1. Radiofarmaceutyk diagnostyczny do obrazowania poziomu cholinoesteraz, który stanowi pochodna takryny N-(1,2,3,4-tetrahydroakrydino-9-yl)nonan-1,9-diamina, (**Tac(9)**), **znamienny tym**, że pochodna ta jest przyłączona do ligandu amidu kwasu hydrazynonikotynowego (Hynic) lub do makrocyklicznego ligandu kwasu 1,4,7,10-tetraazacyklododekano-1,4,7,10-tetraoctowego (DOTA), kwasu 1,4,7,10-tetraazacyklododekano-1,-glutarowo-4,7,10-tetraoctowego (DOTAGA), kwasu 1,4,7-triazacyklononano-trioctowego (NOTA) lub kwasu 1,4,7-triazacyklononano-1-glutarowo-4,7-octowego (NODAGA), wiązaniem amidowym pomiędzy grupą karboksylową ligandu bezpośrednio lub po sfunkcjonalizowaniu jej grupą NHS, lub wiązaniem tioamidowym pomiędzy wcześniej wprowadzoną do cząsteczki używanego ligandu grupą funkcyjną izotiocyanianu fenylu (SCN), a w przypadku ligandów kwasu 1,4,7,10-tetraazacyklododekano-1,-glutarowo-4,7,10-tetraoctowego (DOTAGA) i kwasu 1,4,7-triazacyklononano-1-glutarowo-4,7-octowego (NODAGA) także przy użyciu bezwodników kwasu 1,4,7,10-tetraazacyklododekano-1,-glutarowo-4,7,10-tetraoctowego (DOTAGA) bezwodnik i kwasu 1,4,7-triazacyklononano-1-glutarowo-4,7-octowego (NODAGA), a l-rzędową grupą aminową położoną na końcu łańcucha węglowodorowego pochodnej takryny, jak przedstawiono we wzorach 1, 2, 3, 4 i 5,





wyznakowany radionuklidem – technetem-99 tworzącym kompleks z ligandem Hynic lub radionuklidem diagnostycznym tworzącym kompleksy z ligandem DOTA, DOTAGA, NOTA lub NODAGA, wybranym z grupy obejmującej gal-68, skand-43 lub skand-44.

2. Sposób wytwarzania diagnostycznego radiofarmaceutyku do obrazowania poziomu cholinesteraz, opartego na pochodnej takryny N-(1,2,3,4-tetrahydroakrydino-9-yl)nonan-1,9-diamina, **Tac(9)**, i diagnostycznym radionuklidzie, **znamienny tym**, że do cząsteczki pochodnej takryny przyłącza się chelator amidu kwasu hydrazynonikotynowego (Hynic) lub makrocycliczny ligand kwasu 1,4,7,10-tetraazacyklododekano-1,4,7,10-tetraoctowego (DOTA), kwasu 1,4,7,10-tetraazacyklododekano-1,-glutarowo-4,7,10-tetraoctowego (DOTAGA), kwasu 1,4,7-triazacyklononano-trioctowego (NOTA) lub kwasu 1,4,7-triazacyklononano-1-glutarowo-4,7-octowego (NODAGA) poprzez atom azotu z I-rzędowej grupy aminowej położonej na końcu łańcucha węglowodorowego Tac(9), w taki sposób, że roztwór pochodnej takryny rozpuszczonej w bezwodnym rozpuszczalniku organicznym, wybranym z grupy obejmującej N,N-dimetyloformamid (DMF), dimetylosulfotlenek (DMSO), acetonitryl, miesza się z roztworem chelatora Hynic, DOTA, DOTAGA, NOTA lub NODAGA, w tym samym rozpuszczalniku, a do mieszaniny reakcyjnej dodaje się kilkakrotny nadmiar trietyloaminy (Et_3N), całość wysyca azotem i miesza mieszałem magnetycznym w temperaturze 50°C – 60°C przez okres 24 godzin, przy czym postęp reakcji kontroluje się metodą HPLC, aż do uzyskania koniugatu ligandu Hynic lub makrocyclicznego ligandu DOTA, DOTAGA, NOTA lub NODAGA z cząsteczką pochodnej takryny, co potwierdzono analizą spektrometrii mas (MS), z wydaj-

nością reakcji rzędu 78–93%, po czym uzyskany koniugat Hynic-Tac(9), DOTA-Tac(9), DOTAGA-Tac(9), NOTA-Tac(9) lub NODAGA-Tac(9) znakuje się radionuklidem technetem-99m w przypadku koniugatu Hynic-Tac(9), lub radionuklidem diagnostycznym tworzącym kompleksy z ligandem DOTA, DOTAGA, NOTA lub NODAGA, wybranym z grupy obejmującej gal-68, skand-43 lub skand-44, zgodnie ze znaną procedurą, w przypadku koniugatów Hynic-Tac(9), DOTA-Tac(9), DOTAGA-Tac(9) ogrzewanie w temperaturze 85°C–90°C przez 25 min, w przypadku koniugatów NOTA-Tac(9) i NODAGA-Tac(9) w temperaturze pokojowej przez 10 min, a następnie wyizolowuje się z mieszaniny reakcyjnej dany radiobiokoniugat przy użyciu półpreparatywnej metody wysokoprawnej chromatografii cieczowej (HPLC).

3. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że roztwór pochodnej takryny rozpuszczonej w bezwodnym rozpuszczalniku organicznym, miesza się z roztworem chelatora Hynic, DOTA, DOTAGA, NOTA lub NODAGA, bezpośrednio lub po wcześniejszym wprowadzeniu do cząsteczki chelatora grupy funkcyjnej estru imidobursztynianowego (NHS) lub izotiocyjanianu fenylu (SCN), a w przypadku ligandów DOTAGA i NODAGA także przy użyciu bezwodników kwasu 1,4,7,10-tetraazacyklododekano-1,-glutarowo-4,7,10-tetraoctowego (DOTAGA) bezwodnik i kwasu 1,4,7-triazacyclononano-1-glutarowo-4,7-octowego (NODAGA), w tym samym rozpuszczalniku.
4. Zastosowanie radiofarmaceutyku diagnostycznego, według zastrz. 1, do obrazowania podwyższonego poziomu acetylocholinoesterazy występującego w stanach chorobowych wątroby i jelit, a zwłaszcza w obszarach mózgu, w których na skutek choroby Alzheimera doszło do neurodegeneracji.