(19) SUOMI - FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 931968 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS**
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE PUBLIC

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 931968

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification
C07C229/12
C07F 13/00
A61K 51/00

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **30.04.1993**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **30.04.1993**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **03.11.1993**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

02.05.1992 GB 9209641 P

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • **AnorMED Inc.,** No.100, 20353 - 64th Avenue, Langley, British Columbia V2Y 1N5, KANADA, (CA)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • **Bridger, Gary James,** Bryn Mawr, PA 19010, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
2 • **Hernandez, Pedro Emilio,** Malvern, PA 19356, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
3 • **Higgins, III, John David,** West Chester, PA 19380, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
4 • **Larsen, Scott Kenneth,** West Chester, PA 19380, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention
Parannuksia radioleimauksessa
Förbättringar i radiostämpling

Parannuksia radioleimauksessa

Esillä oleva keksintö koskee parannuksia radioleimauksessa ja tarkemmin ottaen se koskee aiempaa parempia radioisotooppikomplekseja.

Niiden korkean biologisen spesifisyyden johdosta tiettyjä makromolekyylejä, kuten monoklonaalisia vasta-aineita, on käytetty radioisotooppien kohdentamiseksi spesifisiin kohtiin in vivo kuvannustarkoituksissa, diagnostisissa tai terapeuttisissa tarkoituksissa. Kapea-alaisesti vakaan teknetiumisotoopin ^{99m}Tc käyttö diagnostisessa ydinlääketieteessä on perusteellisesti vakiintunut ja reniumin ß-emittoivia isotooppeja ^{186}Re, ^{188}Re ja ^{189}Re voidaan käyttää terapeuttisesti.

Lukuisia menetelmiä teknetiumin kiinnittämiseksi makromolekyyleihin on kuvattu tieteellisessä kirjallisuudessa ja patenttikirjallisuudessa. Viittaamme EP-patenttihakemusjulkaisuun 0 384 769, jossa käsitellään tätä aluetta ja neuvotaan menetelmiä makromolekyylien modifioimiseksi helpomman kiinnityksen radioisotooppikomplekseihin mahdollistamiseksi. Esimerkiksi alalla tällä hetkellä edullinen menetelmä radioleimatun makromolekyylin valmistamiseksi on pelkistää perteknetaatti-ioni $Tc^{VII}O_4^-$ kelatoivan prekursorin läsnä ollessa labiilin Tc-prekursorikompleksin muodostamiseksi, joka saatetaan sitten reagoimaan metallia sitovan ryhmän modifioidussa proteiinissa Tc-proteiinikonjugaatin muodostamiseksi. Lukuisia tämäntyyppisiä kelatoivia prekursoreita on kuvattu teknetiumille mukaan lukien natriumglukoheptonaatti, natriumtartraatti, natriumglukonaatti, natriumsakkaraatti ja natrium-1,1,3,3-propyleenitetrafosfonaatti.

Tällä hetkellä suosituin kelatoiva prekursori on natriumglukoheptonaatti. Tc-glukoheptonaatin käyttö proteiinin radioleimaamiseksi, jota on funktionaalisesti modifioitu hydratsinonikotinamidi (SHNH) -ryhmillä, kuten

julkistetaan edellä mainitussa EP-hakemusjulkaisussa 0 384 769, vaatii 60 minuutin inkuboinnin, ja vaikka voidaan päästä > 95 %:n radioleimaussaantoihin, tämä tapahtuu verraten alhaisella spesifisellä aktiivisuudella < 10 mCi/mg proteiinia. Esillä olevan keksinnön päämäärä on parantaa inkubointiin vaadittavaa aikaa ja/tai spesifistä aktiivisuutta antamalla käyttöön uusi Tc-kompleksi.

Esillä oleva keksintö antaa käyttöön teknetium-kompleksin ligandin L kanssa:

$$(R^3)(R^4)(R^5)C\text{-}N(R)\text{-}C(R^1)(R^2)\text{-}(CH_2)_n\text{-}COOH \qquad (L)$$

jossa

R on vety, hydroksyyli, alkyyli, hydroksialkyyli tai alkyylikarboksi, tai R ja R^1 voivat yhdessä muodostaa mono-, di-, tri- tai tetrametyleeniradikaalin, tai R ja R^2 voivat yhdessä muodostaa mono-, di-, tri- tai tetrametyleeniradikaalin, ja

R^1 ja R^2 voivat olla samanlaiset tai erilaiset ja valitaan kumpikin seuraavista: vety, hydroksyyli, alkyyli, hydroksialkyyli, karboksyyli, alkyylikarboksyyli, alkyyliamiini, alkyylitioli, aryyli, tai R^1 ja R^2 voivat yhdessä muodostaa tetra- tai pentametyleeniradikaalin, ja

R^3 ja R^4 ja R^5 voivat olla samanlaiset tai erilaiset ja valitaan kukin seuraavista: vety, hydroksyyli, alkyyli, hydroksialkyyli, karboksyyli, alkyylikarboksyyli, edellyttäen että ainakin yksi R^3:sta, R^4:stä ja R^5:stä on hydroksialkyyli, ja

n on 0, 1 tai 2.

Edullisia alkyyli- ja substituoituja alkyyliryhmiä R:ksi ovat 1 - 3 hiiliatomin alkyylit. Edullisesti R^1:n ja R^2:n merkitessä alkyyli- tai substituoituja alkyyliryhmiä näissä on 1 - 4 hiiliatomia. Edullisia aryyliryhmiä ovat fenyyli ja bentsyyli. Edullisesti R^3:n, R^4:n ja R^5:n merki-

tessä alkyyli- tai substituoituja alkyyliryhmiä näissä on 1 - 3 hiiliatomia.

Edullisesti ainakin yksi R:stä, R^1:stä ja R^2:sta on vety ja ainakin yksi R^3:sta, R^4:stä ja R^5:stä on hydroksimetyyli. Erityisen edullinen ligandi on N-[tris(hydroksimetyyli)metyyli]glysiini, joka tunnetaan myös nimellä trisiini, jota nimeä käytetään tästä eteenpäin. Muita haluttavia ligandeja L ovat ne, joissa R, R^1 ja R^2 ovat kukin vety, R^3 on vety, metyyli tai etyyli ja R^4 ja R^5 ovat kumpikin hydroksimetyyli tai 2-hydroksietyyli; R, R^1 ja R^2 ovat kukin vety, R^3 ja R^4 ovat kumpikin vety tai metyyli ja R^5 on hydroksimetyyli tai 2-hydroksietyyli. Samoin haluttavia ovat ligandit L, joissa R ja R^1 ovat kumpikin vety, R^2 on metyyli, hydroksyyli, hydroksimetyyli, karboksyyli, karboksimetyyli, 2-karboksietyyli, fenyyli, bentsyyli, 1-hydroksietyyli tai merkaptometyyli ja R^3, R^4 ja R^5 ovat kukin hydroksimetyyli; R on vety, R^1 ja R^2 ovat kumpikin metyyli ja R^3, R^4 ja R^5 ovat kukin hydroksimetyyli; R on hydroksyyli, hydroksimetyyli tai karboksimetyyli, R^1 ja R^2 ovat kumpikin vety ja R^3, R^4 ja R^5 ovat kukin hydroksimetyyli.

Keksintö antaa edelleen käyttöön menetelmän keksinnön mukaisen kompleksin muodostamiseksi, jonka mukaan perteknetaatti-ioni pelkistetään yleisen kaavan L mukaisen ligandin läsnä ollessa.

Keksinnön mukainen menetelmä suoritetaan edullisesti vesiliuoksessa käyttäen tina(2)ionia, esimerkiksi tina(2)kloridia. Mahdollista on käyttää muitakin pelkistyssysteemejä - kuitenkin sillä edellytyksellä, ettei esiinny merkittävää kielteistä vaikutusta tuotekompleksin puhtauteen ja stabiilisuuteen - mutta tina(2)ionipelkistystä pidetään tällä hetkellä parhaana harjoitettavana menetelmänä. Menetelmä suoritetaan menestyksekkäästi yleisesti tunnetuissa olosuhteissa ja huoneenlämpötilassa.

Keksintö antaa samoin käyttöön leimattuja makromolekyylejä, jotka on tuotettu modifioidusta makromolekyylistä ja keksinnön mukaisesta kompleksista. On mahdollista, että ligandi L säilyy kanssaligandina leimatussa makromolekyylissä, mutta tätä ei ole vielä todistettu.

Tietyt tässä julkistetuista ligandeista ovat uusia, etenkin N-[bis(hydroksimetyyli)metyyli]glysiini, jota kutsutaan tästä eteenpäin myös disiiniksi. Uskotaan, että ligandit, joiden yleinen kaava on I:

$$(HOCH_2)_2CH\text{-}N(R)\text{-}C(R^1)(R^2)\text{-}(CH_2)_n\text{-}COOH \qquad (I)$$

jossa R, R^1, R^2 ja n määritellään kuten edellä, muodostavat uuden luokan ja siten osan esillä olevaa keksintöä.

Kaavan I mukaiset ligandit voidaan valmistaa kyvykkäälle synteesikemistille yleisesti käytettävissä olevilla menetelmillä, sopivasti saattamalla bis(hydroksimetyyli)-metyyliamiini reagoimaan funktionalisoidun happojohdannaisen kanssa, jonka yleinen kaava on II:

$$X\text{-}C(R^1)(R^2)\text{-}(CH_2)_n\text{-}COOH \qquad (II)$$

jossa R^1, R^2 ja n määritellään kuten edellä ja X on reaktiivinen ryhmä, esimerkiksi halogeeni, metyyli- tai tolueenisulfonaatti tai trifluorimetyylisulfonaatti, emäksen läsnä ollessa.

Keksintöä kuvataan tarkemmin seuraavissa esimerkeissä ja viitaten oheisiin kuvioihin, joista

kuviossa 1 verrataan IgG-SHNH:n radioleimauksen kolmella erilaisella Tc-prekursorikompleksilla nopeutta huoneenlämpötilassa,

kuviossa 2 verrataan IgG:n radioleimausta kahdella Tc-prekursorikompleksilla erilaisilla spesifisen aktiivisuuden tasoilla ja

kuviossa 3 verrataan IgG:n sarjalaimennosten radioleimausta kahdella Tc-prekursorikompleksilla spesifisen aktiivisuuden funktiona.

Keksinnön seuraavaa kuvausta tulee pitää havainnollistavana eikä mitenkään keksintöä rajaavana.

Esimerkki 1

a) Trisiini/$SnCl_2$-kylmäkuivepakkauksen valmistus

98 ml kromatografialaadun (lasitislattu ja suodatettu) vettä, josta oli happi poistettu keittämällä ja jäähdyttämällä argonkaasussa, mitattiin hapolla pestyyn, huuhdottuun ja kuivattuun 150 ml:n erlenmeyerkolviin, joka sisälsi 3,60 g N-[tris(hydroksimetyyli)metyyli]glysiiniä (trisiiniä). Liuoksen pH säädettiin 7,1:ksi käyttämällä noin 2,3 ml 1 N NaOH-liuosta. Kolvi suljettiin tiiviisti ilmatiiviillä kalvolla ja huuhdottiin vielä 60 minuutin ajan argonilla kanyyliä käyttäen. Valmistettiin $SnCl_2$-$2H_2O$-liuos 50 mg/ml 0,1 N HCl:ään, josta oli happi poistettu, argonkaasussa ja 80 µl lisättiin trisiiniliuokseen. 1 ml trisiini/$SnCl_2$-liuosta siirrettiin ruiskun avulla argonilla täytettyyn, kalvolla suljettuun pieneen pulloon, jäädytettiin ja kylmäkuivattiin sitten. Kylmäkuivatut pienet pullot suljettiin ja haihdutettiin argonkaasussa, jolloin saatiin lopullinen koostumus, jossa oli 36 mg trisiiniä ja 0,04 mg $SnCl_2$:ta pH:ssa 7,1.

b) Trisiini/$SnCl_2$-kylmäkuivepakkauksen rekonstituointi

^{99m}Tc-trisiinin muodostaminen

Kalvolla peitettyyn pieneen pulloon, jossa on kylmäkuivattua trisiini/$SnCl_2$-koostumusta, ruiskutetaan 1 ml $^{99m}TcO_4^-$:ää (20 mCi/ml) ja ravistetaan kiivaasti välittömästi ruiskutuksen jälkeen, kunnes kaikki kylmäkuivattu materiaali on liuennut. Tc-trisiininäytteen liuettua se jätetään 15 - 30 minuutiksi huoneenlämpötilaan ennen analyysiä. Tc-trisiiniprekursorikompleksin muodostuksen analyysi suoritetaan ITLC-SG-kromatografialevyillä. Käyte-

tään 8 x 1 cm:n levyä ja 2,5 µl:n Tc-trisiiniliuosnäyte sijoitetaan täpläksi 1 cm:n päähän reunasta ja eluoidaan suolaliuoksella, jolloin saadaan < 1 % Tc-kolloidia lähtökohtaan ja > 99 % Tc-trisiiniä liuotinrintaman etureunaan. Käytetään 10 x 1 cm:n levyä ja 2,5 µl:n Tc-trisiiniliuosnäyte sijoitetaan täpläksi 1 cm:n päähän reunasta ja eluoidaan käyttäen 2:1 asetoni/dikloorimetaaniliuosta, jolloin saadaan > 99 % ^{99m}Tc-trisiiniä lähtökohtaan ja < 1 % TcO_4^- liuotinrintaman etureunaan.

Immunoglobuliinia (IgG) (mp. = noin 155 000) konjugoitiin SHNH:hon EP-patenttihakemusjulkaisun 0 384 769 esimerkin 9 mukaan ja sitä käytettiin alla kuvatuissa testeissä.

Esimerkki 2

SHNH:lla modifioidun IgG:n radioleimauksen nopeus mitattiin käyttäen kolmea Tc-prekursorikompleksia: Tc-trisiini, Tc-glukoheptonaatti ja Tc-sakkaraatti. 100 µl kutakin Tc-prekursoriliuosta, jonka aktiivisuus oli 15 mCi/ml, sekoitettiin samaan tilavuuteen IgG-SHNH-liuosta, jonka pitoisuus oli 4,9 mg/ml, ja inkuboitiin 1 tunnin ajan huoneenlämpötilassa. Kustakin liuoksesta otettiin näyte ajankohtina 1, 10, 20, 30, 40, 50 ja 60 minuuttia ja analysoitiin ITLC-SG-kromatografisesti tavanomaisia tekniikoita käyttäen. Lisäksi Tc-trisiiniä sekoitettiin samaan tilavuuteen ei-modifioitua IgG:tä sen ei-spesifisen radioleimauksen proteiiniin mittaamiseksi. Tulokset, jotka esitetään kuviossa 1, osoittavat selvästi, että jo minuuttien kuluessa Tc-trisiini radioleimaa proteiinista enemmän kuin 90 %, kun taas Tc-glukoheptonaatti vaatiin tunnin. Lisäksi radioleimauksen määrä saavuttaa maksimin 30 minuutissa Tc-trisiinillä, kun taas Tc-glukoheptonaatti jälleen edellyttää 1 tuntia. Tc-sakkaraatti on selvästi vähiten tehokas radioleimausprekursori IgG-SHNH:lle. Hydratsinonikotinamidiliittäjien puuttuessa proteiinista Tc-trisiini radioleimaa ei-modifioitua IgG:tä vain maksimissaan 4 %. Tämän

vuoksi trisiinin käytöllä Tc-prekursorikompleksin muodostuksessa parannetaan näyttävästi modifioidun IgG:n leimausta glukoheptonaatin käyttöön verrattuna.

Esimerkki 3

SHNH:lla modifioidun IgG:n radioleimauksen prosentuaalinen saanto mitattiin liuosten spesifisen aktiivisuuden (mCi ^{99m}Tc:tä/mg proteiinia) funktiona käyttäen kahta Tc-prekursoria: Tc-glukoheptonaattia, joka oli edeltävän esimerkin 2 määrityksen mukaan parempi alan teknisen tason mukaisista prekursoreista, ja Tc-trisiiniä. Valmistettiin kaksi sarjaa pieniä pulloja, jotka sisälsivät 100, 50, 20, 10, 5 ja 2 µl IgG-SHNH-liuosta (4,9 mg/ml proteiinia). Yhden sarjan kuhunkin pulloon lisättiin 100 µl kulloistakin Tc-prekursoria ja pulloja inkuboitiin 27 °C:ssa 1 tunnin ajan. Testiliuokset analysoitiin ITLC-SG-kromatografisesti käyttäen tavanomaisia tekniikoita. Tulokset, jotka esitetään kuviossa 2, osoittavat proteiinin > 90 %:n radioleimauksen Tc-trisiinin niinkin korkeille spesifisille aktiivisuuksille kuin 140 mCi/mg, kun puolestaan Tc-glukoheptonaatti osoittaa näyttävää laskua radioleimauksen tehokkuudessa spesifisen aktiivisuuden kohotessa yli 25 mCi:n/mg. Tämän vuoksi Tc-trisiiniä käyttämällä parannetaan alhaisten proteiinipitoisuuksien radioleimauksen tehokkuutta.

Esimerkki 4

SHNH:lla modifioidun IgG:n radioleimauksen prosentuaalinen saanto mitattiin spesifisen aktiivisuuden (mCi ^{99m}Tc:tä/mg proteiinia) funktiona laimeille proteiiniliuoksille käyttäen kahta Tc-prekursoria: Tc-trisiiniä ja Tc-glukoheptonaattia. IgG-SHNH-varastoliuoksesta, 4,9 mg/ml sitraattipuskurissa, pH 5,2, valmistettiin 10x laimennettu liuos ja 20x laimennettu liuos käyttäen sitraattipuskuria. 100 µl:n näyte kutakin proteiiniliuosta (pitoisuudet 4,9, 0,49 ja 0,25 mg IgG-SHNH:ta/ml) sekoitettiin samaan tilavuuteen Tc-prekursoriliuosta ja inkuboitiin 1 tunnin ajan

37 °C:ssa. Testiliuokset analysoitiin ITLC/SG-kromatografisesti käyttäen tavanomaisia tekniikoita. Tulokset, jotka esitetään kuviossa 3, osoittavat, että puskuroiduissa olosuhteissa Tc-trisiini jatkaa modifioidun proteiinin radioleimaamista > 90 %:n tehokkuudella korkeammilla spesifisillä aktiivisuuksilla kuin Tc-glukoheptonaatti.

Esimerkki 5

N-[bis(hydroksimetyyli)metyyli]glysiinin,disiinin, synteesi

Serinolia (2,5 g, 26 mmol), kloorietikkahappoa (2,41 g, 26 mmol) ja NaOH-liuosta (3,2 ml 10 N liuosta, 52 mmol) liuotettiin 25 ml:aan vettä ja sekoitettiin huoneenlämpötilassa 16 tunnin ajan. Liuos haihutettiin kuiviin pyöröhaihduttimessa ja saatu lasi liuotettiin takaisin metanoliin. Lisäämällä asetonia saatiin valkea kiinteä aine (2 g, 51 %), joka uudelleenkiteytettiin metanoli/etyyliasetaatista. $C_5H_{11}NO_4$:lle laskettu massaspektri: 149; todettu 150 (M + 1); ^{1}H-nmr D_2O:ssa (0,75 % TMS:ää): 3,85 (m, 4H); 3,80 (s, 2H); 3,45 (m, 1H).

Esimerkki 6

N-hydroksietyyliglysiinin, monosiinin, synteesi

1,0 g glyoksyylihappoa (10,85 mmol), 0,83 ml etanoliamiinia (13,85 mmol) ja 0,34 g natriumsyaaniborohydridiä (5 mmol) sekoitettiin metanolissa huoneenlämpötilassa 48 tunnin ajan. 1,0 ml 12 N HCl:ää (10,85 mmol) lisättiin hitaasti liuokseen, joka sitten haihdutettiin kuiviin pyöröhaihduttimessa. Lisäämällä absoluuttista etanolia samalla nopeasti sekoittaen saatiin valkea kiinteä aine, joka koottiin sintterille ja kuivattiin tyhjössä. $C_4H_9NO_3$:lle laskettu FAB-massaspektri: 119; todettu 142 (m + Na), 164 (m + 2Na); ^{1}H-nmr D_2O:ssa: 3,85 (t, 5, 2H); 3,67 (s, 2H); 3,23 (t, 5, 2H).

Esimerkki 7

N-[tris(hydroksimetyyli)metyyli]alaniinin,metyylitrisiinin, synteesi

2,5 g 2-bromipropionihappoa (16,4 mmol) ja 1,6 ml 10 N NaOH-liuosta (16,4 mmol) liuotettiin 25 ml:aan vettä ja lisättiin 1,98 g N-[tris(hydroksimetyyli)metyyli]amiinia (16,4 mmol) samalla sekoittaen. Liuosta sekoitettiin 80 °C:ssa 6 tunnin ajan, jona aikana lisättiin tipoittain 16 ml 1 N NaOH-liuosta. Liuotin poistettiin pyöröhaihduttimessa haihduttamalla ja saatua lasia kuivattiin yön yli tyhjössä. $C_7H_{15}NO_5$:lle laskettu massaspektri: 193; todettu 194 (m + 1), 216 (m + Na); ^{1}H-nmr D_2O:ssa: 3,66 (q, 7, 1H); 3,21 (s, 6H); 1,13 (d, 7, 3H).

Esimerkki 8

N-[tris(hydroksimetyyli)metyyli]-ß-alaniinin(ß-metyylitrisiinin) synteesi

1,0 g Tris:iä (8,26 mmol) ja 1,0 ml akryylinitriiliä (16 mmol) sekoitettiin metanolissa 70 °C:ssa 48 tunnin ajan. Liuotin poistettiin pyöröhaihduttimessa haihduttamalla ja saatuun lasiin lisättiin absoluuttista etanolia. Reagoimatta jäänyt Tris, joka saostui liuoksesta, suodatettiin eroon ja emäneste suodatettiin lyhyen silikageelitulpan läpi. Haihduttamalla liuos kuiviin saatiin valkea kiteinen kiinteä aine A (0,86 g, 60 %). ^{1}H-nmr: 3,58 (s, 6H); 2,96 (t, 7, 2H); 2,65 (t, 7, 2H).

0,25 g A:ta (14 mmol) keitettiin palautusjäähdyttäen konsentroidussa HCl:ssä 16 tunnin ajan. Liuotin tislattiin eroon pyöröhaihduttimessa ja saatua jäännöstä kuivattiin yön yli tyhjössä 80 °C:ssa. Liuos pyöröhaihduttimessa kuiviin haihduttamalla saatiin likaisen valkeaa kiinteää ainetta, N-[tris(hydroksimetyyli)metyyli]-ß-alaniiniammoniumkloridia.

Esimerkki 9

Tc-L-prekursoriliuoksen valmistus

Vesipohjainen prekursoriliuos ligandista L, esim. trisiinistä, valmistettiin pitoisuudeksi 72 mg/ml veteen,

josta oli happi poistettu ja joka ei sisältänyt metalleja. Prekursorivarastoliuoksen pH säädettiin 7,1:ksi käyttäen 1 N NaOH-liuosta. Toinen varastoliuos $SnCl_2$-$2H_2O$:sta, 10 mg/ml 0,1 N HCl:ssä, valmistettiin ja sitä lisättiin prekursorivarastoliuokseen pitoisuuteen 100 µg/ml $SnCl_2$-$2H_2O$:ta. Prekursori/$SnCl_2$-liuosta sekoitettiin samoissa suhteissa $^{99m}TcO_4^{1-}$:ään (30 mCi/ml). Muutaman minuutin huoneenlämpötilassa kuluttua Tc-ligandiprekursorikompleksin muodostumisen analyysi suoritettiin ITLC-SG-kromatografialevyillä. Käyttäen 8 x 1 cm:n levyä 2,5 µl:n näyte Tc-prekursoriliuosta sijoitetaan täpläksi 1 cm:n päähän reunasta ja eluoidaan suolaliuoksella, jolloin saadaan Tc-kolloidi lähtökohtaan ja Tc-prekursorikompleksi liuotinrintaman etureunaan. Käyttäen 10 x 1 cm:n levyä 2,5 µl:n näyte Tc-prekursoriliuosta sijoitetaan täpläksi 1 cm:n päähän reunasta ja eluoidaan metyylietyyliketonilla tai 2:1 asetoni/dikloorimetaaniliuoksella, jolloin saadaan Tc-prekursori lähtökohtaan ja $^{99m}TcO_4^-$ liuotinrintaman etureunaan.

Tulokset, jotka esitetään taulukossa 1 teknetiumlajin prosentuaalisena saantona liuoksessa, osoittavat selvästi, että tämä menetelmä on yleinen ligandien L teknetiumkomplekseille, joista esitettiin mallit esimerkeissä 1, 5, 6 ja 7. Funktionaalisilla substituutioilla tris-(hydroksimetyyli)metyyliryhmässä tai glysiinissä saadaan edelleen Tc-prekursorikompleksin kvantitatiivinen muodostus minuuteissa huoneenlämpötilassa. Nämä liuokset sopivat proteiinileimaukseen enempää modifioimatta.

Esimerkki 10

SHNH:lla modifioidun IgG:n radioleimaus Tc-L-prekursoreilla

SHNH:lla (hydratsinonikotinamidiryhmiä, kuten kuvataan EP-patenttihakemusjulkaisussa 0 384 769) modifioidun IgG:n radioleimauksen Tc-prekursorikomplekseilla, jotka muodostettiin edeltävässä esimerkissä 9, tehokkuus mitattiin. 100 µl kulloistakin Tc-prekursoriliuosta, jonka pi-

toisuus oli 15 mCi/ml, sekoitettiin samaan tilavuuteen IgG-SHNH-liuosta, 4,9 mg/ml 20 mM sitraattipuskurissa, joka sisälsi pitoisuuden 100 mM NaCl, pH 7,2, ja inkuboitiin 1 tunnin ajan huoneenlämpötilassa. Liuoksesta otettiin ajankohtana 60 minuuttia näyte, joka analysoitiin ohutlevykromatografisesti käyttäen ITLC-SG-levyjä, 1 x 8 cm, ja suolaliuoseluenttia. Tc-leimattu IgG-SHNH tarttuu lähtökohtaan levyssä ja Tc-prekursorit sekä $^{99m}TcO_4^-$ eluoituvat liuotinrintaman etureunaan.

Tulokset, jotka esitetään taulukossa 1 Tc-IgG-SHNH:n prosentuaalisena saantona (ja jotka on korjattu Tc-kolloidin suhteen), osoittavat selvästi, että ligandin L polyhydroksianalogeista muodostetut Tc-prekursorit radioleimaavat kvantitatiivisesti IgG-SHNH:ta. Lisäksi alkyylimodifioimalla glysiini ligandissa L alaniiniksi, mistä metyylitrisiini on esimerkki, saadaan edelleen IgG-SHNH:n kvantitatiivinen radioleimaus, vaikkakin tehokkuus huoneenlämpötilassa laskee. Tämän vuoksi osoitetaan ligandin L polyhydroksiaminohappoanalogien yleinen käyttö Tc-prekursorikompleksien muodostamiseksi ja sittemmin SHNH:lla modifioitujen proteiinien radioleimaamiseksi.

Taulukko 1

Tc-prekursorikompleksien muodostaminen ja IgG-SHNH:n radioleimaus

	Teknetiumlajin liuoksessa prosentuaalinen saanto			Tc-IgG-SHNH:n saanto-%
Näyte	Tc-prekursori	Tc-kolloidi	TcO_4^-	12,5 mCi/mg
Tc-trisiini	98,5	0,2	1,3	97,4
Tc-metyylitrisiini	94,9	0,8	4,3	90,1
Tc-disiini	99,3	0,1	0,6	98,9
Tc-monosiini	84,1	13,9	2	73,3
Tc-ß-metyylitrisiini	57,6	18,2	24,2	75,4*

* > 60 min

Patenttivaatimukset

1. ^{99m}Tc:n kompleksi ligandin L kanssa, t u n n e t t u siitä, että ligandi L on

$$(R^3)(R^4)(R^5)C\text{-}N(R)\text{-}C(R^1)(R^2)\text{-}(CH_2)_n\text{-}COOH \qquad (L)$$

jossa

R on vety, hydroksyyli, alkyyli tai hydroksialkyyli, tai R ja R^1 muodostavat yhdessä mono-, di-, tri- tai tetrametyleeniradikaalin, tai R ja R^3 muodostavat yhdessä mono-, di-, tri- tai tetrametyleeniradikaalin, ja

R^1 ja R^2 ovat samanlaisia tai erilaisia ja tarkoittavat vetyä, hydroksyyliä, alkyyliä, hydroksialkyyliä, karboksyyliä, alkyyliamiinia, alkyylitiolia tai aryyliä, tai R^1 ja R^2 muodostavat yhdessä tetra- tai pentametyleeni- radikaalin, ja

R^3, R^4 ja R^5 ovat samanlaisia tai erilaisia ja tarkoittavat vetyä, hydroksyyliä, alkyyliä, hydroksialkyyliä tai karboksyyliä, sillä edellytyksellä, että vähintään kaksi symboleista R^3, R^4 ja R^5 tarkoittaa hydroksialkyyliä, ja

n on 0, 1 tai 2.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen kompleksi, t u n n e t t u siitä, että ligandissa vähintään yksi symboleista R, R^1 ja R^2 on vety.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen kompleksi, t u n n e t t u siitä, että ligandissa vähintään kaksi symboleista R, R^1 ja R^2 tarkoittaa tahollaan vetyä.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen kompleksi, t u n n e t t u siitä, että ligandissa vähintään yksi symboleista R^3, R^4 ja R^5 on hydroksimetyyli.

5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen kompleksi, t u n n e t t u siitä, että ligandi L on N-[tris(hydroksimetyyli)metyyli]glysiini.

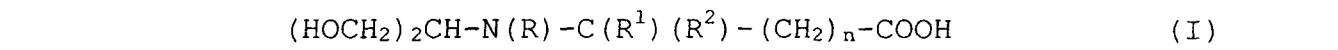
6. Patenttivaatimuksen 1 mukainen kompleksi, t u n n e t t u siitä, että ligandi L on N-[bis(hydroksimetyyli)metyyli]glysiini.

7. Patenttivaatimuksen 1 mukainen kompleksi, t u n n e t t u siitä, että ligandi L on N-[tris(hydroksimetyyli)metyyli]alaniini.

8. Menetelmä patenttivaatimuksen 1 mukaisen kompleksin muodostamiseksi, t u n n e t t u siitä, että perteknetaatti-ioni pelkistetään kaavan L mukaisen ligandin läsnä ollessa.

9. Patenttivaatimuksessa 1 määritellyn kaavan L mukaisen ligandin käyttö kompleksien muodostamiseen radioisotooppien kanssa.

10. Ligandi, jonka kaava on



$$(HOCH_2)_2CH\text{-}N(R)\text{-}C(R^1)(R^2)\text{-}(CH_2)_n\text{-}COOH \qquad (I)$$

jossa R, R^1, R^2 ja n tarkoittavat samaa kuin patenttivaatimuksessa 1.

11. Patenttivaatimuksen 10 mukainen ligandi, t u n n e t t u siitä, että se on N-[bis(hydroksimetyyli)metyyli]glysiini.

FIG.1

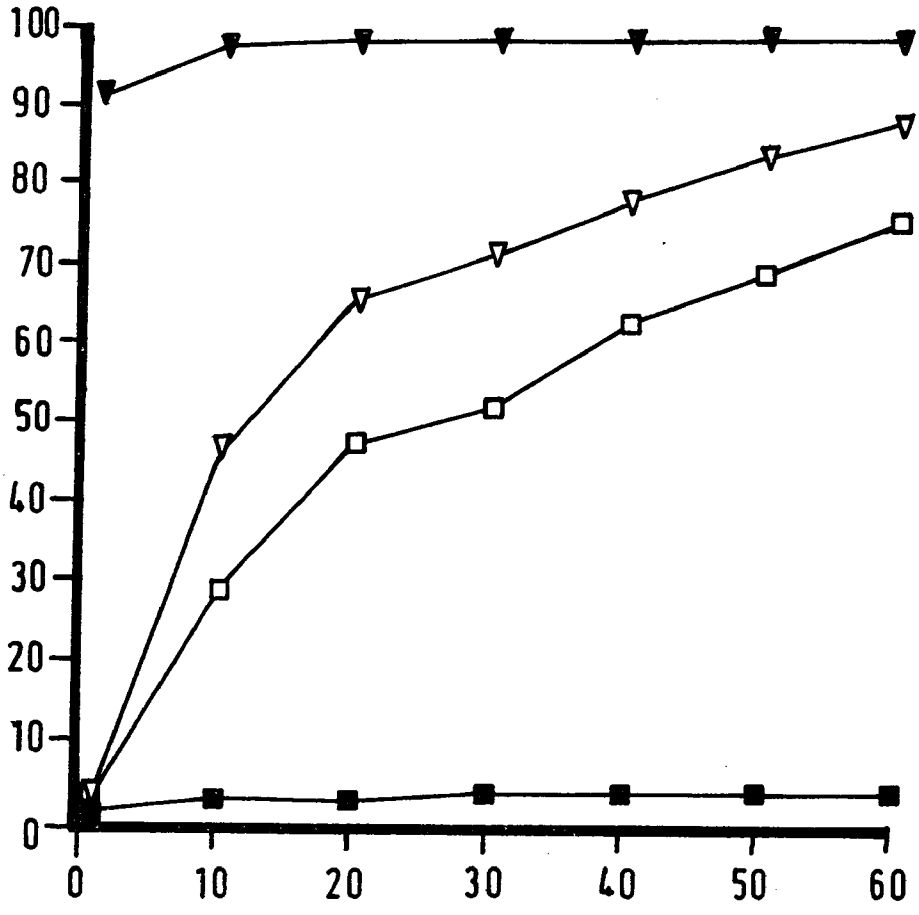


FIG. 2

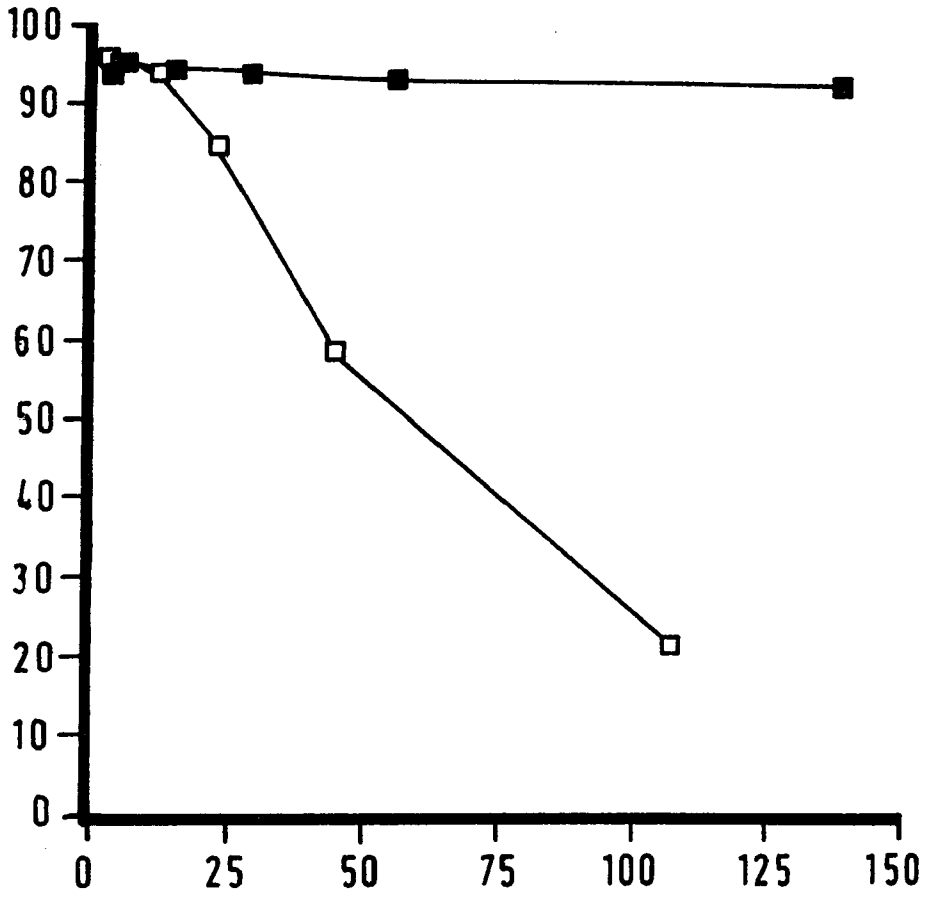
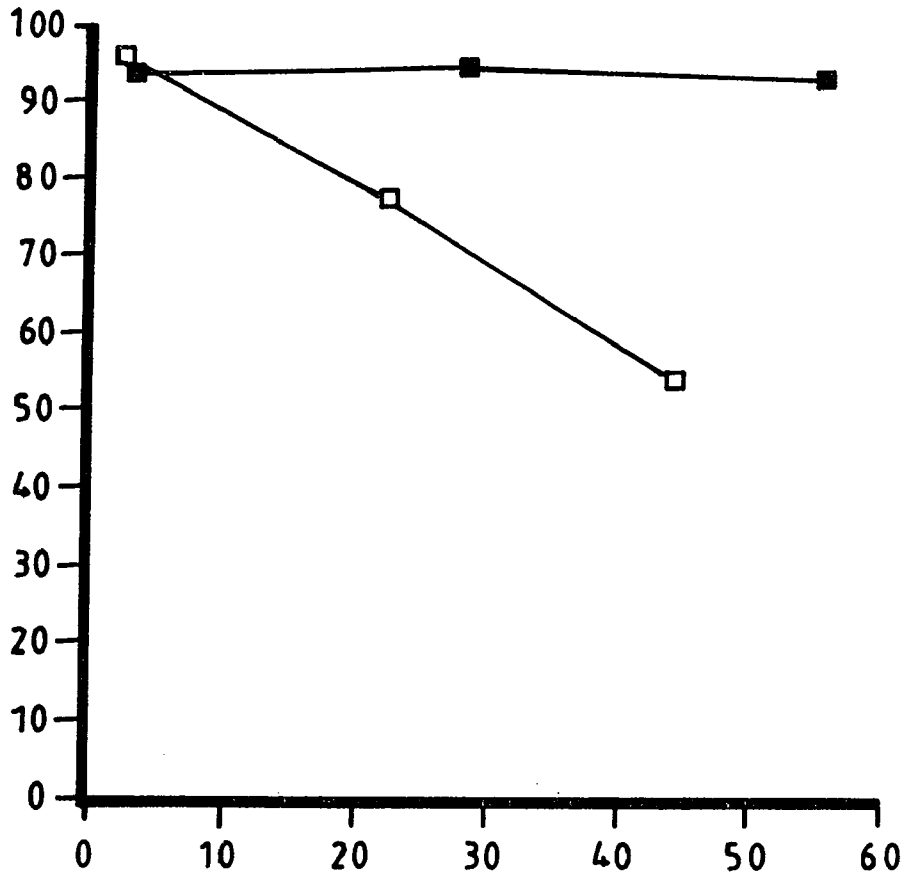


FIG. 3



PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS **TUTKIMUSRAPORTTI**

Patentti- ja innovaatiolinja

HAKEMUSNUMERO	LUOKITUS
931968	☐ jatkuu kääntöpuolella

TUTKITTU AINEISTO

Patenttivirastojen julkaisut

FI, SE, NO, DK, DE, CH, EP, WO, GB, US:

☐ jatkuu kääntöpuolella

Muu aineisto

☐ jatkuu kääntöpuolella

VIITEJULKAISUT

Kategoria*)	Julkaisun tunnistetiedot	Koskee vaatimuksia
X	Bulletin de la Societe Chimique de France,	
	no 5-6, 1975, Z. Mighri et al., s.1160-1164.	
A	Chemical Abstracts, vol. 79 (1973), 66815g.	
A	Chemical Abstracts, vol. 89 (1978), 80938n.	
A	US-A 4772724 (C07D 207/00)	
A	US-A 4425280 (C07F 3/06)	
A	Chemical Abstracts, vol. 95 (1981), 13633v.	
A	Chemical Abstracts, vol. 95 (1981), 93053u.	

☒ jatkuu kääntöpuolella

*) X Patentoitavuuden kannalta merkittävä julkaisu yksinään tarkasteltuna
Y Patentoitavuuden kannalta merkittävä julkaisu, kun otetaan huomioon tämä ja yksi tai useampi samaan kategoriaan kuuluva julkaisu
A Yleistä tekniikan tasoa edustava julkaisu, ei kuitenkaan patentoitavuuden este

Päiväys	Tutkija
5.11.-98	Eira Iflilammi

TUTKITTU AINEISTO (jatkoa etusivulta)

MUU AINEISTO (jatkoa etusivulta)

VIITEJULKAISUT (jatkoa etusivulta)

A	EP-A 384769	(C07D 207/46)
A	US-A 4017596	(A61K 43/00)
A	US-A 4113850	(A61K 29/00)