



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) BR 112014023988-6 B1**



**(22) Data do Depósito:** 26/03/2013

**(45) Data de Concessão:** 02/02/2021

**(54) Título:** MÉTODO DE PREPARAÇÃO DE UM CONJUGADO DE TIAZOLIDINA-AÇÚCAR, COMPOSIÇÃO DE CONJUGADO DE ETILENODICISTEÍNA-AÇÚCAR E SEU USO

**(51) Int.Cl.:** A61K 49/06; A61K 31/425; A61K 31/70; C07D 277/06; C07D 277/04.

**(30) Prioridade Unionista:** 26/03/2012 US 61/615,684.

**(73) Titular(es):** BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM.

**(72) Inventor(es):** DAVID J. YANG; DONG-FANG YU.

**(86) Pedido PCT:** PCT US2013033919 de 26/03/2013

**(87) Publicação PCT:** WO 2013/148710 de 03/10/2013

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 26/09/2014

**(57) Resumo:** MÉTODO DE PREPARAÇÃO DE UM CONJUGADO DE TIAZOLIDINA-AÇÚCAR, COMPOSIÇÃO DE CONJUGADO DE ETILENODICISTEÍNA-AÇÚCAR E SEU USO. São divulgados métodos de síntese de conjugados de etilenodicisteína-açúcar e aplicações terapêuticas e de diagnóstico de tais conjugados. Métodos de síntese destes conjugados com elevada pureza também são apresentados quando se utiliza materiais de partida tais como ácido tiazolidina carboxílico. Também são divulgados métodos de formação de imagens, tratamento e diagnóstico de doença em um indivíduo que utiliza estes conjugados aqui preparados, tais como os métodos de formação de imagem de um tumor dentro de um indivíduo e métodos de diagnóstico de isquemia do miocárdio.

## **"MÉTODO DE PREPARAÇÃO DE UM CONJUGADO DE TIAZOLIDINA-AÇÚCAR, COMPOSIÇÃO DE CONJUGADO DE ETILENODICISTEÍNA-AÇÚCAR E SEU USO".**

[001] O presente pedido reivindica o benefício de prioridade do Pedido de Patente Provisório US Nº 61/615,684, depositado em 26 de Março de 2012, que é incorporado por referência neste documento, em sua totalidade.

### **ANTECEDENTES DAS INVENÇÕES**

#### **1. Campo da Invenção**

[002] A presente invenção refere-se geralmente aos campos de síntese química, imageamento, radioterapia, rotulagem, quimioterapia, terapia médica, tratamento de doenças cardiovasculares e tratamento de câncer. Mais particularmente, a invenção concerne a novos métodos de síntese de conjugados para imageamento e terapia molecular..

#### **2. Descrição do Estado da Técnica Relacionado**

[003] Sobre preparações sintéticas de agentes moleculares para a rotulagem de metal, quando esses agentes são preparados em condições aquosas (úmida), a purificação dos agentes, às vezes, pode apresentar um problema. Purificação em condições aquosas pode ser conseguida usando, por exemplo, cromatografia de exclusão de tamanho ou diálise com membranas de cortes de peso molecular específico; por exemplo, diálise normalmente é mais eficaz ao separar espécies de pesos moleculares de 1000 g/mol ou superiores. No entanto, este método de purificação frequentemente isola não só o agente desejado, mas também qualquer outra espécie que pode passar através da membrana. Introdução de impurezas em agentes de imagem pode ser problemática em futuras aplicações dos agentes de imagem, especialmente a respeito de usos de imageamento e/ou terapêuticos. Por exemplo, se um agente da imagem incorporando um radionuclídeo (o agente de imagem "verdadeiro") é concebido para ser puro, mas na

verdade contém impurezas que também incorporam um radionuclídeo, a adequada medição ou detecção do agente de imagem "verdadeiro" pode ser obscurecida ou falsa devido à presença da impureza.

[004] Métodos de síntese de compostos orgânicos em solventes orgânicos e o uso de grupos protetores, normalmente oferecem melhorias na purificação de compostos sobre purificações aquosas. A instalação de grupos protetores permite que vários grupos funcionais de intermediários sejam protegidos durante a síntese e facilita a purificação desses intermediários. Vários meios de purificação utilizando solventes orgânicos permitem a separação e isolamento de compostos desejados, como agentes de imagem, com pouquíssimas impurezas. Além disso, espécie de pesos molecular abaixo dos 1000 g/mol muitas vezes facilmente pode ser purificada usando métodos de purificação de química orgânica. Tendo em conta os benefícios oferecidos por síntese orgânica e purificação sobre purificação aquosa, métodos de síntetização orgânica e purificação de agentes de imagens provavelmente renderiam em agentes de pureza maior que aqueles obtidos através de purificação aquosa. No entanto, a adição e remoção de grupos protetores podem incorrer em custos adicionais e reduzir a eficiência e purificação dos produtos finais.

[005] Assim, existe uma necessidade para a preparação destes e de outros agentes usando técnicas sintéticas para permitir agentes de purezas superiores obtidos de forma mais eficiente.

#### SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[006] Aspectos da invenção fornecem novos métodos para a preparação de um conjugado de açúcar de tiazolidina e um conjugado de açúcar de etilenodisticéia. Para a preparação de um conjugado de açúcar de tiazolidina, o método pode compreender a mistura um açúcar amino com um ácido carboxílico de tiazolidina, deste modo, produzindo o conjugado de açúcar de tiazolidina. Para preparar um conju-

gado de açúcar de etilenodicisteína, o método pode adicionalmente compreender reduzir o conjugado de açúcar de tiazolidina com um agente redutor que compreende um metal alcalino e uma fonte de elétron.

[007] Por exemplo, o açúcar amino é uma amino hexose ou uma amino pentose. Exemplos não limitantes da amino hexose incluem um amino derivado da glicose, galactose, manose, idose, talose, altrose, alose, gulose ou frutose. Um exemplo específico da amino hexose é glucosamina. Exemplos não limitantes de amino pentose incluem um amino derivado da ribose, xilose, arabinose ou lixose. O açúcar amino é um açúcar tendo um grupo amino, localizado na posição 2', 3', 4' ou 5' do açúcar. Em um aspecto particular, o açúcar amino tem um grupo amino posicionado na posição 2' no anel de açúcar.

[008] O método de admistura pode ser realizado em um solvente orgânico, tais como a dimetilformamida, dimetilsulfóxido, dioxano, metanol, etanol, hexano, cloreto de metileno, acetonitrilo, tetrahidrofurano ou uma mistura dos mesmos. Em outros aspectos, o método de admistura pode ser realizado em um solvente aquoso.

[009] Um, dois, três, quatro, cinco ou todos os grupos hidroxil do açúcar amino podem ser protegidos, por exemplo, por um grupo acetil ou benzoíla, ou desprotegido. Um exemplo específico, o açúcar amino é glucosamina protegida por grupos do acetil, tais como 1,3,4,6-tetra-O-acetil-2-amino- $\alpha$ -D- cloridrato de glucopirranose. Grupos protetores geralmente são usados na síntese orgânica e não em síntese não aquosa.

[0010] Métodos da presente invenção podem adicionalmente compreender pelo menos uma etapa de purificação. Qualquer composto da presente invenção pode ser purificado através de um método conhecido para aqueles versado na técnica. Pessoas versadas na técnica são familiarizadas com esses métodos, e quando esses métodos

podem ser empregados. Por exemplo, em uma síntese de várias etapas que é visada na chegada em um determinado composto, uma etapa de purificação pode ser executada após cada etapa sintética, após todas as etapas, em vários pontos durante a síntese e/ou no final da síntese. Em alguns métodos, uma ou mais etapas de purificação compreendem a técnica selecionada do grupo constituído por cromatografia em coluna de sílica-gel, HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência) e LC (cromatografia líquida). Em determinadas modalidades, métodos de purificação excluem especificamente a cromatografia de exclusão de tamanho e/ou diálise. Métodos de purificação são descritos mais detalhadamente abaixo. Em um aspecto particular, o método pode compreender purificar o conjugado de açúcar de tiazolidina antes da redução.

[0011] Para preparar um conjugado de açúcar de etilenodicisteína, o conjugado de açúcar de tiazolidina pode ser reduzido por um metal alcalino e uma fonte de elétron. Os metais alcalinos podem ser de lítio, sódio ou potássio. A fonte de elétrons pode ser amônia líquida, metilamina, etilamina ou etilenodiamina. Em um aspecto particular, a redução pode ser uma redução Birch.

[0012] Para gerar um conjugado de açúcar de etilenodicisteína (EC) rotulado por íon metálico, o método pode adicionalmente compreender quelar um íon metálico para o conjugado de açúcar de etilenodicisteína. Por exemplo, o íon metálico é selecionado a partir do grupo de íons metálicos, consistindo em um íon de tecnécio, um íon estanho, um íon cobre, um íon de índio, um íon de tálio, um íon de gálio, um íon de arsênio, um íon de rênio, um íon de hólmio, um íon de ítrio, um íon de samário, um íon de selênio, um íon estrôncio, um íon gadolínio, um íon de bismuto, um íon de ferro, um íon manganês, um íon de lutécio, um íon de cobalto, um íon de platina, um íon de cálcio e um íon de ródio. Em alguns aspectos, o íon metálico é um radio-

nuclídeo e qualquer radionuclídeo conhecido pelos versados na técnica. Exemplos não limitantes de radionuclídeos incluem  $^{99m}\text{Tc}$ ,  $^{117m}\text{Sn}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{89}\text{Sr}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{183}\text{Gd}$ ,  $^{59}\text{Fe}$ ,  $^{225}\text{Ac}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{45}\text{Ti}$ ,  $^{60}\text{Cu}$ ,  $^{61}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{64}\text{Cu}$  and  $^{62}\text{Cu}$ . Em outros aspectos, o íon metálico é um metal não radioativo como  $^{187}\text{Re}$ .

[0013] Outras modalidades da invenção dizem respeito aos métodos de imageamento de um local, diagnosticar uma doença ou tratamento de uma doença dentro de um sujeito que a compreende. O método pode incluir a obtenção de um conjugado de açúcar de etilenocisteína (EC) marcado por íon metálico preparado conforme descrito neste documento e administrando ao sujeito uma quantidade farmacologicamente eficaz ou um conjugado de açúcar de etilenodicitestina (EC) rotulado por íon de metal, em que o local é imageado, a doença é diagnosticada, ou a doença é tratada.

[0014] O local a ser imageado pode ser um tumor. O método pode ser ainda definido como um método de tratamento de um sujeito com câncer. Em aspectos particulares, o câncer é câncer de mama, câncer de pulmão, câncer de próstata, câncer de ovário, câncer cerebral, câncer de fígado, câncer de colo uterino, câncer de cólon, câncer renal, câncer de pele, câncer de cabeça e pescoço, câncer ósseo, um câncer de esôfago, câncer de bexiga, câncer uterino, câncer linfático, câncer de estômago, câncer pancreático, câncer testicular, linfoma ou leucemia.

[0015] Em aspectos adicionais, o método pode ser adicionalmente definido como um método de imageamento de um local dentro de um sujeito que inclui a detecção de um sinal do conjugado de açúcar de etilenodicitestina (EC) rotulado por íon de metal que está localizado no local. O sinal pode ser detectado usando uma técnica selecionada a partir do grupo consistindo em PET, PET/CT, CT, SPECT, SPECT/CT, MRI, PET/MRI, SPECT/MRI, imageamento óptico e do ultrassom.

[0016] O local a ser imageado pode ser um coração. O método pode ser ainda definido como um método de imageamento, diagnosticar ou tratar um sujeito com uma doença cardiovascular. A doença cardiovascular pode ser um infarto do miocárdio, insuficiência cardíaca congestiva, cardiomiopatia, doença valvular cardíaca, arritmia, doença cardíaca congênita, angina pectoris, antiagregantes congestão circulatória, sistólica insuficiência cardíaca, insuficiência cardíaca com função sistólica normal ou insuficiência cardíaca direita.

[0017] Em uma posterior modalidade uma composição conjugada ou kit é fornecido compreendendo um conjugado de açúcar de etilenodisticistina de acordo com as modalidades e neomicina. Em alguns aspectos, a composição compreende cerca de 0,1 mg a cerca de 1,0 mg de neomicina por 1 mg de conjugado de açúcar de etilenodisticistina (*por exemplo*,, cerca de 0.2-0.8, 0.3-0.7, 0.4-0.6 ou 0,5 mg / 1 mg de conjugado açúcar de etilenodisticistina). Em aspectos adicionais a composição mais pode incluir antioxidantes, agentes estabilizantes, conservantes ou sais. Por exemplo, uma composição adicionalmente pode compreender ácido ascórbico, cisteína, e/ou cloreto de estanho (II). Em alguns aspectos específicos uma composição compreende (a) cerca de 0,5 a 2,0 mg de ácido ascórbico por 1 mg de açúcar de etilenodisticistina ; (b) cerca de 0.1 a 1.0 mg de cisteína por 1 mg de conjugado de açúcar de etilenodisticistina; e/ou (c) cerca de 0,05 a 0,5 mg de cloreto de estanho (II) por 1 mg de conjugado de açúcar de etilenodisticistina. Em alguns aspectos, a composição é uma solução aquosa ou uma solução que foi congelada e/ou liofilizada.

[0018] Em uma modalidade relacionada é fornecido um método de fazer uma composição conjugada composto por (a) dissolvendo-se um conjugado daçúcar de etilenodisticistina e neomicina em solução aquosa (*por exemplo*,, uma solução de cloreto de estanho(II)); e (b) submetendo a solução à liofilização ou congelamento para fornecer uma

composição de conjugado de açúcar de etilenodicisteína. Da mesma forma, é fornecido um método de fazer um quelato metal de um conjugado de açúcar de etilenodicisteína constituído por uma solução que inclui o conjugado ethylenedicysteine-açúcar e neomicina com um íon metálico (por exemplo, um íon metálico radioativo) em condições adequadas para formar um quelato.

[0019] Ainda em uma modalidade adicional é fornecido um método de imagem de um local, diagnosticar uma doença ou tratamento de uma doença dentro de um sujeito compreendendo administrar um conjugado de açúcar de etileno (EC) marcado com íon metálico a um paciente em conjunto com neomicina. Por exemplo, o método pode incluir (a) a obtenção de uma composição compreendendo conjugado de açúcar de etilenodicisteína rotulado com íon metálico e neomicina; e (b) administrar ao sujeito uma quantidade eficaz farmacologicamente ou para o diagnóstico da composição, em que o local é imageado, a doença é diagnosticada, ou a doença é tratada.

[0020] Em ainda uma modalidade adicional uma composição é fornecida compreendendo um conjugado de açúcar de etilenodicisteína rotulado com íon de metal e neomicina (*por exemplo*, cerca de 0,1 mg de cerca de 1,0 mg de neomicina por 1 mg de conjugado ethylenedicysteine-açúcar). Por exemplo, em alguns aspectos, a composição é para uso em imageamento de um local, diagnosticar uma doença ou tratamento de uma doença dentro de um sujeito.

[0021] Modalidades discutidas no contexto de um método e/ou composição da invenção podem ser empregadas em relação a qualquer outro método ou composição aqui descritos. Assim, uma modalidade pertencente a um método ou composição pode ser aplicada a outros métodos e composições da invenção também.

[0022] Como usado aqui, a especificação, "um" ou "uma" significa um ou mais. Como usado neste documento, nas reivindicações, quan-



do usado em conjunto com a palavra "composto", as palavras "uma" ou "uma" podem significar um ou mais de um.

[0023] O uso do termo "ou" na reivindicação é usado para significar "e/ou" a menos que explicitamente indicado, de outro modo, para se referir a apenas alternativas ou as alternativas são mutuamente exclusivas, embora a divulgação suporte uma definição que se refere a apenas alternativas e "e/ou". Neste documento "outro(a)" pode significar pelo menos um segundo ou mais.

[0024] Em todo este pedido, o termo "cerca de" é usado para indicar que um valor inclui a variação inerente de erro para o dispositivo, o método sendo empregado para determinar o valor ou a variação que existe entre os sujeitos do estudo.

[0025] Outros objetivos, características e vantagens da invenção atual serão evidentes a partir da seguinte descrição detalhada. Deve-se compreender, entretanto, que a descrição detalhada e os exemplos específicos, ao indicar as modalidades preferidas da invenção atual, estão apresentados por a ilustração somente, desde que as várias mudanças e modificações dentro do princípio e do escopo da invenção atual se tornarão aparentes àquelas pessoas versadas na técnica desta descrição detalhada.

#### BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0026] As figuras a seguir fazem parte da especificação presente e estão incluídas para demonstrar adicionalmente certos aspectos da presente invenção. A invenção pode ser mais bem entendida por referência a uma ou mais dessas figuras em combinação com a descrição detalhada de modalidades específicas aqui apresentadas.

[0027] A figura 1. Síntese Eficiente de ECG.

[0028] A figura 2. Análise TLC de  $^{68}\text{Ga}$ -ECG utilizando soro fisiológico como um eluente. Análise de Rádio-TLC da pureza de  $^{68}\text{Ga}$ -ECG foi > 96%.

[0029] A figura 3. Análise HPLC de  $^{68/69}\text{Ga}$ -ECG e ECG (Fase móvel:  $\text{H}_2\text{O}$ /acetonitrila, 9:1 V/V, taxa de fluxo: 0,5 ml/min, a coluna: C18 – estende (Agilent), UV ABS 210nm). Análise HPLC da pureza de  $^{68}\text{Ga}$ -ECG foi > 96%.

[0030] A figura 4. ITLC (topo a, em soro fisiológico) e HPLC (fundo b, detector Nal) análise  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -ECG (fase móvel:  $\text{H}_2\text{O}$ /acetonitrila, 9:1 V/V, taxa de fluxo: 0,5 ml/min, Coluna: C18 – estende (Agilent), UV ABS 210nm). (210nm). Análise de Rádio-TLC e HPLC de análise da pureza  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -ECG foram > 96%.

[0031] A figura 5.  $^{18}\text{F}$ -FDG e  $^{68}\text{Ga}$ imagem de Ga-ECG PET em ratos de portando mesotelioma (400  $\mu\text{Ci}$  /rato, iv, 45 minutos adquiridos) . Regiões de interesse (ROI) delineadas por computador (contagens por pixel) para o tumor e músculo no intervalo de tempo correspondente foram usados para gerar um gráfico dinâmico. Representação gráfica dinâmica foi de 0 a 45 minutos.

[0032] A figura 6.  $^{68}\text{Ga}$ -ECG PET imagens em rato portando mesotelioma (400  $\mu\text{Ci}$  /rato, iv, parte inferior do corpo), antes e após o tratamento em 45 minutos. Topo: linha de base no tumor de tamanho 1,5 cm, fundo: tratados com paclitaxel (dose única de 20 mg/kg, iv, no dia 7). T: tumor.

[0033] A figura 7. Cintilografia planar  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -EC (esquerda) e  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -ECG os (300  $\mu\text{Ci}$  /rato, iv, contagem de 500.000 adquirida) (meio e direita) em ratos portando mesotelioma. Os números são relações de densidade de contagem tumor-músculo em 1 hr (painel superior) e 2 hrs (painel inferior). T: tumor.

[0034] A figura 8.  $^1\text{H}$  RMN de G-Ac-T

[0035] A figura 9  $^{13}\text{C}$  RMN de T-G(Ac)4

[0036] A figura 10. MS de T - G-(Ac) 4

[0037] A figura 11.  $^1\text{H}$  RMN de EC-G

[0038] A figura 12.  $^{13}\text{C}$  RMN de EC-G

- [0039] A figura 13. Espectro de massa de EC-G
- [0040] A figura 14. HPLC de EC-G
- [0041] A figura 15.  $^{99m}\text{Tc}$ EC-G (ITLC, usando salina como eluante)
- [0042] A figura 16. Análise cromatográfica de Camada Instante-Estanho  $^{99m}\text{Tc}$ -EC-G utilizando soro fisiológico como uma fase móvel. Papel: Waterman No. 1; Gato No.: 3030614. Painel da esquerda é o produto feito usando o kit divulgado neste documento; painel à direita é um padrão  $^{99m}\text{Tc}$ -EC-G.
- [0043] A figura 17 Análise HPLC  $^{99m}\text{Tc}$ -EC-G feita usando o kit divulgado neste documento usando  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$  (9:1) como um eluente com a taxa de 0,50 mL/min. Coluna: Estende C18; SN: USFK004129, Agilent).
- [0044] A figura 18). Análise HPLC do padrão  $^{99m}\text{Tc}$ -EC-G feita usando  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$  (9:1) como um eluente com a taxa de 0,50 mL/min. Coluna: Estende C18; SN: USFK004129, Agilent).
- [0045] A figura 19. Absorção de kit feito e padrão  $^{99m}\text{Tc}$ -EC-G em 13762 células de tumor mamário de rato. Colunas à esquerda são produto do kit e colunas da direita são o padrão do produto.

#### DESCRIÇÃO DETALHADA DAS MODALIDADES PREFERENCIAIS

- [0046] A presente invenção se refere a novos métodos sintéticos para a preparação de um conjugado de açúcar de tiazolidina como precursores para preparar um conjugado de açúcar de etilenodicisteína. A presente invenção adicionalmente fornece métodos sintéticos de um conjugado de açúcar de etilenodicisteína. Em alguns aspectos destes métodos sintéticos podem tornar óbvia a necessidade de adição de grupos protetores de etilenodicisteína (EC) e aumentar a eficiência do processo e purificar dos produtos finais em comparação com outros métodos, como descrito na Publ. Patente US N°. 20100055035 (incorporado neste documento por referência).
- [0047] Em certos aspectos, pelo menos uma parte dos métodos da

presente invenção realiza-se em um solvente orgânico. Escolhas de solventes para os métodos da presente invenção serão conhecidas por um versado na técnica. Escolhas de solventes podem depender, por exemplo, qual (s) irá facilitar a solubilização de todos os reagentes, ou, por exemplo, qual(s) melhor facilitará a reação desejada (particularmente se o mecanismo da reação é conhecido). Solventes podem incluir, por exemplo, solventes polares e/ou solventes não polares. Um solvente pode ser um solvente polar aprótico, tal como dimetilsulfóxido. Escolhas de solventes incluem, mas não estão limitadas a, dimetilformamida, dimetilsulfóxido, dioxano, metanol, etanol, hexano, cloreto de metileno, tetrahydrofurano, ou acetonitrilo. Em algumas modalidades, o solvente inclui etanol, dimetilformamida e/ou dioxano. Mais de um solvente pode ser escolhido para qualquer reação particular ou procedimento de purificação. Água também pode ser misturada em qualquer escolha de solvente; isso pode ser feito para melhorar a solubilidade de um ou mais reagentes, por exemplo. Métodos baseados na química úmida (aquosa) também são fornecidos.

[0048] Conforme descrito neste documento, alguns aspectos da invenção envolvem o uso de grupos de proteção para proteger o açúcar amino em sua reação com tiazolidina ou seus derivados. No entanto, aspectos da invenção podem obviar a necessidade de adição de grupos de proteção para etilenodicitosina (EC) como na Publ. Patente US. Nº. 20100055035.

[0049] Quando uma reação química deve ser realizada seletivamente em um local reativo em um composto multifuncional, outros devem ser temporariamente bloqueados. Um "grupo protetor", ou "grupo protegido-nucleofílico" como usado aqui, é definido como um grupo usado para efeitos deste bloqueio temporário. Durante a síntese de macromoléculas da presente invenção, vários grupos funcionais devem ser protegidos usando grupos protetores(ou agentes de prote-

ção) em várias fases da síntese. Há vários métodos conhecidos para aqueles versados na técnica realizarem um tal etapa. Para agentes protetores, sua reatividade, instalação e utilização, ver, , *por exemplo*,, Greene e Wuts (1999), aqui incorporados por referência em sua totalidade. A função de um grupo protetor é proteger uma ou mais funcionalidades (*por exemplo*,,  $-NH_2$ ,  $-SH$ ,  $-COOH$ ) durante reações subsequentes que não procederia, também porque o livre (em outras palavras, desprotegido) grupo funcional iria reagir e ser acrescido de uma maneira que seja inconsistente com a sua necessidade de ser livre para reações subsequentes, ou grupo funcional livre iria interferir na reação. O mesmo grupo protetor pode ser usado para proteger um ou mais dos grupo(s) funcional(is), o mesmo ou diferente. Além disso, diferentes grupos protetores podem ser usados para proteger o mesmo tipo de grupo funcional dentro de uma macromolécula da presente invenção em várias etapas.

[0050] Em aspectos particulares, os grupos hidroxil do açúcar amino como matéria-prima podem ser protegidos. Grupos protetores hidróxi (ou álcool) são bem conhecidos para aqueles versados na técnica. Ver, por exemplo, Greene e Wuts (1999), Capítulo 2. Estes grupos de proteção podem ser instalados via agentes protetores conhecidos aos versados na técnica. Remoção desses grupos também é bem conhecida por aqueles versados na técnica.

[0051] Um grupo protetor hidróxi apropriado pode ser selecionado do grupo constituído por ésteres e éteres. Ésteres como grupos acetato, benzoíla, tert-butilcarbonil e trifluoroacetil são removíveis por condições ácidas ou básicas. Éteres como metoxi, etoxi e tri-benzilmetil são removíveis por fortes condições ácidas ou básicas. Um grupo de proteção preferencial é um éster de acetato.

[0052] A presente invenção contempla métodos para admisturar um açúcar amino com um ácido carboxílico de tiazolidina. A condição

para mistura pode incluir quaisquer condições adequadas para formar uma ligação peptídica entre o açúcar amino e o ácido carboxílico tiazolidina, tais como um ou mais agentes de acoplamento ou catalisadores. Agentes de ligação, como usados aqui, são os reagentes utilizados para facilitar o acoplamento de um grupo amino e um grupo carboxílico para formar uma ligação peptídica. Esses agentes são conhecidos por aqueles versados na técnica e podem ser empregados em determinadas modalidades de métodos da presente invenção. Exemplos de agentes de ligação incluem, mas não são limitados a, sulfo-N-Hidroxissuccinimida (sulfo-NHS), dimetilaminopiridina (DMAP), diazabícclo [5.4.0] undec-7-eno (DBU), 1-etil - 3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDAC) e dicitclohexilcarbodiimida (DCC). Outras carbodiimidas são também visadas como agentes de acoplamento. Agentes de acoplamento são discutidos, por exemplo, Bodansky, 1993 e Grant, 1992. Estes agentes de acoplamento podem ser usados isoladamente ou em combinação com outro ou outros agentes para facilitar a conjugação. O produto conjugado então pode ser purificado por, por exemplo, cromatografia em coluna de sílica-gel ou HPLC.

[0053] Em alguns aspectos da invenção, não há nenhuma necessidade para uma reação de desproteção separada. A reação de redução pode remover grupos de proteção durante a conversão o conjugado de açúcar de etilenodicisteína para um conjugado de açúcar de etilenodicisteína. A reação de redução compreende o uso de um agente redutor compreendendo um metal alcalino e uma fonte de elétrons, , *por exemplo*, uma base de Lewis. Os metais alcalinos podem ser de lítio, sódio ou potássio. A fonte de elétrons pode ser uma base de Lewis como amônia líquida, metilamina, etilamina ou etilenodiamina. Em um aspecto particular, a redução pode ser uma redução Birch. Por exemplo, o agente redutor para a redução de Birch é composto de metal de lítio ou de sódio e amônia líquida. Em modalidades alternativas,

o agente redutor é composto por metal de lítio, sódio metálico, metal potássio, ou o metal cálcio e metilamina ou etilamina. A mistura de reação de redução de Birch pode incluir uma mistura de solvente. Esta mistura solvente pode compreender álcool t-butílico, álcool isopropílico (IPA), tetrahidrofurano (THF), amônia ou suas combinações. Dependendo os reagentes usados, a redução de Birch pode ocorrer a uma temperatura de cerca de  $-80^{\circ}\text{C}$  a cerca de  $55^{\circ}\text{C}$ . Quando o amoníaco líquido é usado como um reagente, a redução pode ter lugar em cerca de  $-80^{\circ}\text{C}$  a cerca de  $-35^{\circ}\text{C}$ . Quando metilamina ou etilamina é usada como um reagente, a redução pode ocorrer em uma temperatura de cerca de  $-10^{\circ}\text{C}$  a cerca de  $10^{\circ}\text{C}$ . A mistura de reação de redução de Birch é mantida nas temperaturas acima por cerca de 10 minutos por cerca de 4 horas.

[0054] Como mencionado acima, pessoas versadas na técnica na técnica estarão familiarizadas com os métodos de purificação de compostos da presente invenção. Como usado aqui, "purificação" refere-se a qualquer aumento mensurável na pureza em relação à pureza do material antes da purificação. Purificação de cada composto da presente invenção é geralmente possível, incluindo a purificação de intermediários, bem como a purificação dos produtos finais. A etapa de purificação não é sempre incluída nas metodologias gerais explicadas abaixo, mas uma versado na técnica vai entender que compostos geralmente podem ser purificados em qualquer etapa. Exemplos de métodos de purificação incluem a filtração em gel, cromatografia de exclusão de tamanho (também chamada cromatografia de filtração em gel, cromatografia de permeação de gel ou de exclusão molecular), diálise, destilação, recristalização, por sublimação, derivatização, eletroforese, cromatografia em coluna de sílica-gel e cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), incluindo a HPLC de fase normal e de HPLC de fase reversa. Em determinadas modalidades, cromatografia

de exclusão e/ou diálise é especificamente excluído como formas de purificação de compostos da presente invenção. Purificação de compostos através de cromatografia em coluna de sílica-gel ou HPLC, por exemplo, oferece o benefício de rendimento compostos desejados em pureza muito alta, muitas vezes maior do que quando os compostos são purificados através de outros métodos. A pureza radioquímica de compostos da presente invenção também pode ser determinada. Métodos para determinar a pureza radioquímica são conhecidos na técnica e incluem métodos cromatográficos em conjunto com métodos de detecção de radioatividade (*por exemplo*, análises de autoradiografia). Exemplos de comparações da pureza de compostos feitos através de metodologias orgânicas e molhadas e purificada por métodos diferentes são fornecidos abaixo.

[0055] Métodos para determinar a pureza de compostos são conhecidos para aqueles versados na técnica e incluem, em exemplos de não limitantes de autoradiografia, espectroscopia de massa, determinação de ponto de fusão, análise ultravioleta, análise calorimétrica, (HPLC), cromatografia de camada fina e análise de ressonância magnética nuclear (RMN) (incluindo, mas não limitado a,  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  RMN). Em algumas modalidades, um método calorimétrico poderia ser usado para dosar a pureza dos produtos finais ou intermediários. Em uma modalidade, a pureza de um composto desconhecido pode ser determinada ao se comparar com um composto de pureza conhecido: esta comparação pode ser sob a forma de uma relação cuja medição descreve a pureza do desconhecido. Software disponível em variados instrumentos (*por exemplo*, espectrofotômetros, HPLCs, NMRs) pode ajudar um versado na técnica a fazer essas determinações, bem como outros meios conhecidos por aqueles de habilidade na arte.

[0056] A presente invenção ainda contempla métodos para a que-  
lação (também chamado de coordenação) de um ou mais metal íons



para o conjugado de açúcar de etilenodicisteína para gerar um conjugado de açúcar de etilenodicisteína (EC) rotulado por íon metálico. Tais etapas de quelação podem ocorrer em um solvente orgânico. Em outras modalidades, quelação ocorre em meio aquoso. Em determinadas modalidades, o quelante EC e o açúcar podem, cada um, contribuir para a quelação do íon metálico. Em modalidades preferenciais, o íon metálico é quelado apenas para o quelante EC. O íon metálico quelado pode ser delimitado, por exemplo, através de uma ligação iônica, uma ligação covalente ou uma ligação covalente coordenada (também chamada de uma ligação dativa). Tais métodos de coordenação são bem conhecidos por aqueles versados na técnica. Em uma modalidade, coordenação pode ocorrer por mistura de um íon metálico em uma solução contendo o conjugado de açúcar de etilenodicisteína. Em outra modalidade, coordenação pode ocorrer por admisturar um íon metálico em uma solução contendo um conjugado de açúcar EC.

[0057] Em alguns exemplos não limitantes, o íon de metal pode ser tecnécio, índio, rênio, gálio, cobre, hólmio, platina, gadolínio, lutécio, ítrio, cobalto, cálcio, arsênico ou qualquer isótopo respectivo. Qualquer íon metálico aqui descrito pode ser quelado para a um composto da presente invenção.

[0058] Certos aspectos da presente invenção pertencem às composições em que uma porção terapêutica é conjugada com um conjugado quelante da presente invenção, como um conjugado de açúcar de etilenodicisteína. A composição da presente invenção pode, em determinadas modalidades, ser útil na terapia e em imageamento duplo. Em determinadas modalidades particulares, a porção terapêutica é uma porção que é um agente conhecido ou suspeito de ser benéfico no tratamento ou prevenção de doença de hiperproliferatividade em um sujeito. O sujeito pode ser um animal, como um mamífero. Em modalidades específicas, o sujeito é um ser humano.

[0059] Em outras modalidades da presente invenção, a porção terapêutica é um íon metálico terapêutico (*por exemplo*, Re-188, Re-187, Re-186, Ho-166, Y-90, Sr- 89 e Sm-153), e o conjugado açúcar de etilenodicisteína quelado por metal é um agente que é um agente terapêutico (ao invés de um agente de imagem) que pode ser aplicado no tratamento ou prevenção de doenças hiperproliferativas.

[0060] Uma doença hiperproliferativa é definida aqui como qualquer doença associada com o crescimento de células anormais ou renovação celular anormal. Por exemplo, a doença hiperproliferativa pode ser câncer. O termo "câncer", como usado aqui, é definido como um crescimento progressivo e descontrolado de células em um tecido. Um versado na técnica está ciente de que existem outros termos sinônimos, como neoplasia ou malignidade ou tumor. Qualquer tipo de câncer é contemplado para tratamento pelos métodos da presente invenção. Por exemplo, o câncer pode ser câncer de mama, câncer de pulmão, câncer de próstata, câncer de ovário, câncer cerebral, câncer de fígado, câncer de colo uterino, câncer de cólon, câncer renal, câncer de pele, câncer de cabeça e pescoço, câncer ósseo, um câncer de esôfago, câncer de bexiga, câncer uterino, câncer linfático, câncer de estômago, câncer pancreático, câncer testicular, linfoma ou leucemia. Em outras modalidades da presente invenção, o câncer é o câncer metastático.

[0061] Em determinadas modalidades da presente invenção, as composições da presente invenção são adequadas para quimioterapia dupla e radioterapia (radiochemotherapy). Por exemplo, o conjugado açúcar EV de quelante como estabelecido aqui pode ser quelado para um íon metálico que é um íon metálico terapêutico, bem como uma porção terapêutica (como uma porção anticâncer). Como outro exemplo, um íon metálico terapêutico pode ser quelado para o EC e a porção de açúcar no conjugado de açúcar EC.

[0062] Por exemplo, o íon de metal pode ser um emissor beta. Conforme definido neste documento, um emissor beta é qualquer agente que emite energia beta de qualquer escala. Re-188, Re-187, Re-186, Ho-166, Y-90 e Sn-153 são exemplos de emissores de beta. Um versado na técnica seria familiarizado com estes agentes para uso no tratamento da doença hiperproliferativa, como o câncer.

[0063] Um versado na técnica estaria familiarizado com o projeto de protocolos quimioterápicos e protocolos de terapia radiação que podem aplicados na administração dos compostos da presente invenção. Tal como descritos abaixo, estes agentes podem ser usados em combinação com outras modalidades terapêuticas dirigidas no tratamento de uma doença hiperproliferativa, como o câncer. Além disso, um versado na técnica seria familiarizado com a seleção de uma dose adequada para a administração ao sujeito. O protocolo pode envolver uma dose única ou múltiplas doses. O paciente poderia ser monitorado para toxicidade e resposta ao tratamento usando protocolos familiares ao versado na técnica.

[0064] Composições farmacêuticas da presente invenção compreendem uma quantidade eficaz terapeuticamente ou para o diagnóstico de uma composição da presente invenção. As frases "farmacêutica ou farmacologicamente aceitável" ou "eficax terapeuticamente" ou "de diagnóstico efetivo" referem-se a entidades moleculares e composições que não produzem uma reação adversa, alérgica ou outra reação adversa quando administradas a um animal, tais como, por exemplo, um ser humano, conforme o caso. A preparação de composições terapeuticamente eficazes ou eficazes para o diagnóstico será conhecida aos versados na técnica à luz da divulgação presente, como exemplificado por Remington's Pharmaceutical Sciences, 18<sup>a</sup> Ed. Mack Printing Company, 1990, incorporado neste documento por referência. Além disso, para administração animal (por exemplo, humano), será enten-

dido que os preparativos devem atender esterilidade, pirogenicidade, segurança geral e pureza exigidos pelo Escritório da FDA de Padrões Biológicos (FDA Office of Biological Standards).

[0065] Tal como aqui usado, "uma composição compreendendo uma quantidade terapeuticamente eficaz" ou "uma composição compreendendo uma quantidade diagnosticamente efetiva" inclui todos e quaisquer solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes tensoativos, antioxidantes, conservantes (por exemplo, agentes antibacterianos, agentes anti-fúngicos), agentes isotônicos, agentes de retardamento da absorção, sais, conservantes, estabilizantes, drogas farmacêuticas, géis, ligantes, excipientes, agentes de desintegração, lubrificantes, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, corantes, tais como os materiais e combinações dos mesmos, como seria conhecido a um versado na técnica. Exceto no caso em que qualquer portador convencional ser incompatível com o ingrediente ativo, seu uso na composição presente é contemplado.

[0066] As composições da presente invenção podem incluir diferentes tipos de transportadores, dependendo se é para ser administrado na forma de sólido, líquido ou aerossol, e se ele precisa ser esterilizado para essas vias de administração como injeção. As composições da presente invenção podem ser administradas por via intravenosa, intradérmica, intra-arterial, intraperitoneal, intralesionalmente, intracraniana, intra-articular, intraprostaticamente, intrapleural, intratraqueal, intranasal, via intravítrea, intravaginal, intrarectal, tópica, intratumoral, intramuscular, intraperitoneal, subcutânea, subconjuntival, intravesicular, através das mucosas, intrapericardica, intraumbilical, intraocular, oralmente, topicamente, localmente, injeção, infusão, infusão contínua, perfusão de banho localizada células alvo diretamente, por meio de um cateter, por meio de uma lavagem, em composições de lípidos (por exemplo, lipossomas), ou por outro método, ou qualquer combinação

dos anteriores, tal como seria conhecido de um versado na técnica.

[0067] A quantidade efetiva requerida de uma composição da presente invenção administrada a um paciente pode ser determinada por fatores físicos e fisiológicos tais como o peso corporal, a gravidade da condição, o tecido a ser visualizado, o tipo de doença a ser tratada, imageamento anterior ou concomitante ou intervenções terapêuticas, idiopatia do paciente, e a via de administração. O médico responsável pela administração determinará, em qualquer caso, a concentração de ingrediente ativo(s) em uma composição e dose(s) apropriada para o sujeito individual.

[0068] Em determinadas modalidades, composições farmacêuticas podem incluir, por exemplo, pelo menos cerca de 0,1% do quelato de íon de metal quelante. Em outras modalidades, a um composto ativo pode incluir entre cerca de 2% a cerca de 75% em peso da unidade, ou cerca de 25% a cerca de 60%, por exemplo, e qualquer intervalo derivável nele. Em outros exemplos não limitantes, uma dose pode também compreender de aproximadamente de cerca de 0,1 mg/kg/peso a cerca de 1000 mg/kg corporal/de peso corporal ou qualquer quantidade dentro desse intervalo, ou qualquer valor superior a 1000 mg/kg/peso do corpo por administração .

[0069] Em qualquer caso, a composição pode incluir vários antioxidantes para retardar a oxidação de um ou mais componentes. Além disso, a prevenção da ação de microorganismos pode ser provocada por conservantes tais como vários agentes antibacterianos e antifúngicos, incluindo, mas não se limitando a parabenos (*por exemplo*, metilparabenos, propilparabenos), clorobutanol, fenol, ácido sórbico, time-rosal ou suas combinações.

[0070] As composições da presente invenção podem ser formuladas em forma de base livre, neutra ou sal. Sais farmaceuticamente aceitáveis incluem os sais formados com os grupos carboxil livre deri-

vado de bases inorgânicas, como por exemplo, sódio, potássio, amônio, cálcio ou hidróxidos férricos; ou tais bases orgânicas como isopropilamina, trimetilamina, histidina ou procaína.

[0071] Em modalidades onde a composição é uma forma líquida, um transportador pode ser um solvente ou meio de dispersão que inclui, mas não se limitando a, água, etanol, poliol (*por exemplo*, glicerol, propilenoglicol, polietilenoglicol líquido, etc), lipídios (por exemplo, *de*, triglicerídeos, óleos vegetais, lipossomas) e suas combinações. A fluidez adequada pode ser mantida, por exemplo, pelo uso de um revestimento, como lecitina; pela manutenção da necessária do tamanho de partícula por dispersão em operadoras como, por exemplo líquido poliol ou lipídios; pelo uso de surfactantes como, por exemplo, hidroxipropilcelulose; ou combinações respectivas de tais métodos. Em muitos casos, será preferível incluir agentes isotônicos, por exemplo, açúcares, cloreto de sódio ou suas combinações.

[0072] Soluções injetáveis estéreis podem ser preparadas usando técnicas tais como a esterilização filtrada. Geralmente, as dispersões são preparadas, incorporando os vários ingredientes ativos esterilizados em um excipiente estéril que contém um meio de dispersão básico e/ou outros ingredientes. No caso de pós estéreis para a preparação de soluções injetáveis estéreis, suspensões ou emulsões, os métodos de preparação preferenciais são técnicas de secagem a vácuo e de liofilização que produz um pó de um ingrediente ativo mais qualquer ingrediente adicional desejado a partir de um meio líquido filtrado estéril do mesmo. O meio líquido deve ser convenientemente tamponado, se necessário, e o líquido diluente processada primeiro isotônico antes da injeção com solução salina suficiente ou glicose. A preparação das composições altamente concentradas para injeção direta também é contemplada, onde o uso de DMSO (dimetilsulfóxido) como solvente é visionado para resultar na penetração extremamente rápida, oferecen-

do altas concentrações dos agentes ativos para uma pequena área.

[0073] A composição deve ser estável sob as condições de fabricação e armazenamento e pode ser preservada contra a ação contaminante de micro-organismos tais como bactérias e fungos. Será apreciado essa que tal contaminação de endotoxinas deve ser mantida minimamente em nível seguro, por exemplo, menos que 0,5 ng/mg de proteína.

[0074] Em modalidades particulares, absorção prolongada de uma composição injetável pode ser provocada pelo uso nas composições de agentes, atrasando a absorção, tais como, por exemplo, monoestearato de alumínio, gelatina ou suas combinações.

[0075] As composições da presente invenção podem ser utilizadas em uma variedade de técnicas de medicina nuclear para geração de imagens conhecidas por aqueles versados na técnica. Por exemplo, imagem de câmera gama é contemplada como um método de imagem que pode ser utilizado para medir um sinal derivado do íon do metal quelatado para o conjugado de açúcar EC. Um versado na técnica estaria familiarizado com técnicas para a aplicação de imageamento de câmera gama (ver, por exemplo, Kundra et al., 2002, especificamente aqui incorporados por referência).

[0076] Modalidades de imageamento de radionuclídeos (tomografia por emissão de pósitrons, (PET), tomografia computadorizada de emissão de fóton único (SPECT)) são técnicas de imagem transversais de diagnósticos que mapeiam a localização e a concentração dos radiomarcadores rotulados por radionuclídeo. Embora CT e MRI forneçam informações anatômicas consideráveis sobre a localização e a extensão dos tumores, estas modalidades de imagem adequadamente não podem diferenciar lesões invasivas de edema, necrose de radiação, graduação ou gliose. PET e SPECT podem ser usados para localizar e caracterizar tumores medindo a atividade metabólica.

[0077] PET e SPECT fornecem informações referentes a informações a nível celular, como a viabilidade celular. Em PET, um paciente ingere ou é injetado com uma substância ligeiramente radioativa que emite pósitrons, que podem ser monitorados na medida em que a substância se move pelo corpo. Em uma aplicação comum, por exemplo, os pacientes recebem glicose com emissores de pósitrons anexados, e os cérebros deles são monitorados na medida em que eles executam várias tarefas. Já que o cérebro usa glicose na medida em que funciona, uma imagem PET mostra onde a atividade cerebral é alta.

[0078] Intimamente relacionado com PET está a tomografia computadorizada por emissão de fóton único, ou SPECT. A principal diferença entre os dois é que, em vez de uma substância de emissores de pósitrons, SPECT usa um marcador radioativo que emite fótons de baixa energia. SPECT é valiosa para o diagnóstico de doença arterial coronariana, e já cerca de 2,5 milhões estudos cardíacos SPECT são feitos nos Estados Unidos a cada ano.

[0079] Radiofármacos PET para imageamento são comumente rotulados com emissores de pósitron como  $^{11}\text{C}$ ,  $^{13}\text{N}$ ,  $^{15}\text{O}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{82}\text{Rb}$ ,  $^{62}\text{Cu}$  e  $^{68}\text{Ga}$ . Os medicamentos radiofarmacêuticos SPECT são comumente rotulados com emissores de pósitrons como  $^{99m}\text{Tc}$ ,  $^{201}\text{Tl}$  e  $^{67}\text{Ga}$ . Em relação a imageamento do cérebro, radiofármacos PET e SPECT são classificados de acordo com a permeabilidade da barreira hemato-encefálica (BBB), a perfusão cerebral e a ligação do receptor de metabolismo e ligação antígeno-anticorpo (Saha, *et al.* 1994). Agentes SPECT de barreira hemato-encefálica, como  $^{99m}\text{TcO}_4\text{-DTPA}$ ,  $^{201}\text{Tl}$  e  $^{67}\text{Ga}$  citrato são excluídos por células cerebrais normais, mas entram em células tumorais por causa do BBB alterado. Agentes de perfusão SPECT como  $^{123}\text{I}$  IMP,  $^{99m}\text{Tc}$  HMPAO,  $^{99m}\text{Tc}$  ECD são agentes lipofílicos e, portanto, se espalham no cérebro normal. Importantes radiofarmacêuticos SPECT de ligação ao receptor incluem  $^{123}\text{I}$



QNE [ $^{123}\text{I}$ ] IBZM, e [ $^{123}\text{I}$ ] iomazenil. Estes marcadores se ligam a receptores específicos e são de importância na avaliação de doenças relacionadas com o receptor.

[0080] Tomografia computadorizada (CT) é contemplada como uma modalidade de imageamento no contexto da presente invenção. Ao tomar uma série de raios-x, às vezes mais do que mil, de vários ângulos e então combiná-las com um computador, CT tornou possível construir uma imagem tridimensional de qualquer parte do corpo. Um computador é programado para exibir as fatias bidimensionais de qualquer ângulo e em qualquer profundidade.

[0081] Em CT, injeção intravenosa de um agente de contraste radiopaco pode auxiliar na identificação e delimitação das massas de tecidos moles quando CT inicial não é de diagnóstico. Da mesma forma, agentes de contraste ajudam a avaliar a vascularização de uma lesão de tecido macio ou osso. Por exemplo, o uso de agentes de contraste pode ajudar a delineação da relação de um tumor e estruturas vasculares adjacentes.

[0082] Agentes de contraste CT incluem, por exemplo, meios de contraste iodado. Lotalamate, iohexol, diatrizoate, iopamidol, etiodol e iopanoate são exemplos desses agentes. Agentes de gadolínio também foram relatados para ser úteis como um agente de contraste da CT (ver, por exemplo, Henson et al., 2004). Por exemplo, agentes gadopentate têm sido usados como um agente de contraste da CT (discutido em Strunk e Schild, 2004).

[0083] Imageamento de ressonância magnética (RMI) é uma modalidade de imageamento mais recente que o CT que usa um sinal de ímã e rádio-freqüência de alta resistência para produzir imagens. A espécie molecular mais abundante em tecidos biológicos é a água. É a quantidade mecânica "spin" dos núcleos prótons água que, finalmente, dá origem ao sinal em experimentos por imagens. Na ressonância

magnética, a amostra a ser fotografada é colocada em um forte campo magnético estático (Tesla 1-12) e as rotações são excitadas com um pulso de radiação de radiofrequência (RF) para produzir uma magnetização líquida na amostra. Vários gradientes de campo magnético e outros pulsos RF então atuam sobre as rotações de informação espacial de código para os sinais gravados. Coletando e analisando esses sinais, é possível calcular uma imagem tridimensional que, como uma imagem de CT, normalmente é exibida em fatias bidimensionais.

[0084] Os agentes de contraste utilizados em imageamento de MR latente diferem das utilizadas em outras técnicas de imagem. Sua finalidade é auxiliar na distinção entre componentes de tecido com características de sinal idêntico e encurtam os tempos de relaxamento (que produzirá um sinal mais forte nas imagens de spin-eco ponderadas em T1 e um sinal de menos intenso em imagens ponderadas em T2). Exemplos de agentes de contraste de MRI incluem quelato de gadolínio, manganês quelato, cromo quelato e partículas de ferro.

[0085] Tanto CT e MRI fornecem informações anatômicas que ajuda na distinção entre limites de tecido e estrutura vascular. Comparado ao CT, as desvantagens da MRI incluem baixa tolerância do paciente, contraindicações em marcapassos e certos outros dispositivos metálicos implantados e artefatos relacionados a várias causas, não o pelo menos dos quais é movimento (Alberico *et al.*, 2004). CT, por outro lado, é rápida, bem tolerada e prontamente disponível, mas tem resolução de contraste menor do que o MRI e necessita de contraste iodado e radiação ionizante (Alberico *et al.*, 2004). Uma desvantagem de CT e MRI é que nenhuma modalidade de imageamento fornece informações funcionais a nível celular. Por exemplo, nenhuma modalidade fornece informações sobre a viabilidade celular.

[0086] imageamento óptico é outra modalidade de imageamento que ganhou aceitação generalizada em áreas específicas da medicina.

Exemplos incluem rotulagem óptica dos componentes celulares e angiografia como angiografia fluoresceína e angiografia verde de indocianina. Exemplos de agentes de imagem óptico incluem, por exemplo, fluoresceína, um derivado da fluoresceína, indocianina verde, verde Oregon, um derivado do derivado de Oregon verde, verde rodamina, um derivado de rodamina verde, uma eosina, um eritrosina, Vermelho Texas, um derivado do Texas vermelho, verde malaquita, s sulfosuccinimidil éster de nano ouro, azul cascata, um derivado de cumarina, um naftaleno, um derivado de piridiloxazol, corante amarelo cascata ou tintura de dapoxil.

[0087] Outra modalidade de imageamento biomédico que ganhou aceitação generalizada é o ultrassom. Ultrassonografia tem sido usada de forma não invasiva para fornecer imagens transversais em tempo real e mesmo tridimensionais de estruturas de tecidos moles e a informação do fluxo de sangue no corpo. Ondas sonoras de alta frequência e um computador para criar imagens de vasos sanguíneos, tecidos e órgãos.

[0088] Ecografia do fluxo de sangue pode ser limitada por uma série de fatores tais como tamanho e profundidade do vaso sanguíneo. Agentes de contraste ultrassônico, um desenvolvimento relativamente recente, incluem perfluorina e análogos de perfluorina, que são projetados para superar essas limitações, ajudando a aumentar a escala de cinza imagens e sinais Doppler.

[0089] Determinadas modalidades da presente invenção referem-se aos métodos de imageamento de um local dentro de um sujeito usando duas modalidades de imagem que envolvem um primeiro sinal e um segundo sinal de imagem de complexo íon de metal de porção quelante—. O primeiro sinal é derivado do íon de metal e o segundo sinal é derivado da porção de imageamento. Conforme definido acima, qualquer modalidade de imageamento conhecida pelos versados na

técnica pode ser aplicada nessas modalidades dos métodos de imagem presentes.

[0090] As modalidades de imagem são realizadas a qualquer momento durante ou após a administração da composição que inclui a quantidade eficaz para o diagnóstico da composição da presente invenção. Por exemplo, os estudos de imagem podem ser realizados durante a administração da composição de imagem dupla da presente invenção, ou em qualquer momento posterior. Em algumas modalidades, a primeira modalidade de imagem é feita começando simultaneamente com a administração do agente de imagem dupla, ou cerca de 1 seg, 1 hora, 1 dia, ou qualquer período de tempo após a administração do agente de imagem duplo, ou a qualquer momento entre qualquer um destes tempos citados.

[0091] A segunda modalidade de imagem pode ser realizada simultaneamente com a primeira modalidade de imageamento, ou em qualquer tempo após a primeira modalidade de imagem. Por exemplo, a segunda modalidade de imageamento pode ser realizada cerca de 1 segundo, cerca de 1 hora, cerca de 1 dia ou mais período de tempo seguinte conclusão da primeira modalidade de imagem, ou a qualquer momento entre qualquer um destes tempos declarados. Em determinadas modalidades da presente invenção, a primeira e segunda modalidades de imagem são executadas simultaneamente, tais que comecem ao mesmo tempo após administração do agente. Uma pessoa versada na técnica estaria familiarizada com o desempenho das várias modalidades de imageamento previstas pela presente invenção.

[0092] Em algumas modalidades dos métodos presentes de imageamento duplo, o mesmo dispositivo de imageamento é usado para realizar uma primeira modalidade de imagem e uma segunda modalidade de imagem. Em outras modalidades, um dispositivo de imageamento diferente é usado para executar a segunda modalidade de ima-

gem. Um versado na técnica estaria familiarizado com os dispositivos de imagem disponíveis para o desempenho de uma modalidade de imagem primeira e uma segunda modalidade de imagem, e o artesão versado na técnica estaria familiarizado com o uso desses dispositivos para gerar imagens. Mais detalhes dos métodos diagnósticos e terapêuticos podem ser encontrados em US 2008/0107198 (incorporados neste documento por referência).

[0093] Os exemplos a seguir são incluídos para demonstrar modalidades preferenciais da invenção. Deve ser apreciado, por aqueles versados na técnica, que as técnicas divulgadas nos exemplos que se seguem representam técnicas que os inventores descobriram funcionar bem na prática da invenção e, assim, podem ser consideradas para constituir os exemplos dos modos preferenciais para sua prática. No entanto, aqueles versados na técnica devem, à luz da presente divulgação, apreciar que muitas mudanças podem ser feitas nas modalidades específicas as quais são divulgadas e ainda obter um resultado parecido ou semelhante, sem se desviar do espírito e do escopo da invenção.

## EXEMPLOS

### EXEMPLO 1 - SÍNTESE DE N, N-ETILENODICISTEÍNA-GLUCOSAMINA (EC-G). VER FIG. 1.

#### **GERAL**

[0094] Todos os produtos químicos e solventes foram obtidos da Sigma-Aldrich (St Louis, MO). Ressonância magnética nuclear (RMN) foi realizada no espectrômetro Bruker 300MHz Spectrometer e espectros de massa foram realizados no espectrômetro de massa Waters Q-TOF Ultima Mass Spectrometer (Milford, MA) na instalação de núcleo da Universidade do Texas, MD, Anderson Cancer Center (UTMDACC; Houston, TX). Mudanças químicas foram relatadas em  $\delta$  (ppm) e  $J$  valores em Hertz. FDG foi obtido do Departamento de Medicina Nuclear

em UTMDACC.

## SÍNTESE DE ECG

### Etapa 1: Síntese de T-G-(Ac)<sub>4</sub>

[0095] Para uma solução de ácido tiazolidina-4-carboxílico (T) (2,6 g, 0,02 mol) em DMF (20 ml) e 5,0 ml trimetilamina, hidrato de 1-hidroxibenzotriazol 2,7 g (0,02 mol) foi adicionado. Depois de 30 min, cloridrato de 1,3,4,6-tetra-O-acetil-2-amino- $\alpha$ -D-glucopirranose (G-(Ac)<sub>4</sub>) (7,7 g, 0,02 mol), N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC; 4,2 g, 0,02 mol) e 4-dimetilaminopiridina (DMAP; 1,2 g, 0,01 mol) foram adicionados à mistura e agitados durante a noite na temperatura ambiente. A solução foi evaporada para secagem em alto vácuo. Diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) (50 ml) foi adicionado ao residual e mantido a 4°C durante a noite, em seguida, filtrado. O produto foi purificado com sílica-gel por eluição com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH(95/5, V/V) para render o produto branco T-G-(Ac)<sub>4</sub> 4,08 g (44,2%). RMN e espectrometria de massa foram usados para confirmar a estrutura de T-G-(Ac)<sub>4</sub>.

### Etapa 2: Reação de Redução

[0096] Sódio foi adicionado parte a parte para uma solução de T-G-(Ac)<sub>4</sub> (4,08 g, 8,8 mmol) em amônia líquida (170 g). A cor da solução lentamente foi mudada para azul escuro. Após 30 minutos, foi adicionado uma pequena quantidade de cloreto de amônio. A amônia líquida foi removida por pressão reduzida. O sólido residual foi triturado com metanol (100 ml). O sólido foi então filtrado e lavado com metanol adicional (50 ml) para produzir o produto bruto 4,16 g. Para obter ECG pura analítica, o produto bruto (0,1 g) foi dissolvido em 1,0 ml de HCl (0,1 N) e purificado com coluna de Sephadex por eluição com H<sub>2</sub>O. As frações aquosas foram combinadas e liofilizadas para rendimento ECG 0,029 g (46,7%). RMN e espectrometria de massa e HPLC foram usados para confirmar a estrutura de ECG.

## RESULTADOS

[0097] O esquema sintético é mostrado em FIG. 1. ECG foi sintetizado por duas etapas de reações. Na primeira etapa, ácido tiazolidina-4-carboxílico (T) foi reagido com cloridrato de 1,3,4,6-tetra-O-acetil-2-amino- $\alpha$ -D-glucopiranosose (G-(Ac)<sub>4</sub>) na presença de hidrato de hidroxibenzotriazol-1, DCC e DMAP. Após a purificação, o rendimento do produto T-G-(Ac)<sub>4</sub> foi de 44,2%. <sup>1</sup>H RMN (D<sub>2</sub>O,  $\delta$ ): 1,97-2,14 (m, 12 H) 3,88 (t, 1 H), 3,93 (s, 2H), 4,05-4,10 (m, 6H) 4,22-4,30 (m, 2 H), 5,09 (t, 1H), 5,34 (t, 1H), 5,80 (d, 1H), 6,93 (d, 1H). <sup>13</sup>C RMN(D<sub>2</sub>O,  $\delta$ ): 171,19, 171,00, 170,65, 169,35, 166,35, 141,76, 92,05, 82,45, 72,79, 72,02, 68,02, 61,73, 60,39, 53,21, 42,32, 20,84, 20,68, 20,58, 20,55. FAB MS m/z: 462,5.

[0098] Na segunda etapa, T-G-(Ac)<sub>4</sub> foi reduzida por sódio em amônia líquida (redução de Birch). O produto bruto foi purificado com uma coluna de Sephadex ao rendimento ECG (46,7%). HPLC mostra que a pureza é superior a 82%. <sup>1</sup>H RMN (D<sub>2</sub>O,  $\delta$ ): 3,15-3,20 (m, 4H) 3,78-4,05 (m, H 6), 4,08-4,15 (m, 8H), 4,2-4,3(d, 2H), 4,68-4,73 (d, 2h), 5,19-5,21(d, 2H). <sup>13</sup>C RMN (D<sub>2</sub>O,  $\delta$ ): 174,81 174,56, 94,95, 90,87, 90,84, 75,96, 73,91,73,85, 71,59, 70,71, 70,66, 70,10, 69,88, 60,72, 60,62, 56,72, 54,11, 23,33, 22,23, 21,96. FAB MS m/z: 591

#### EXEMPLO 2 - SÍNTESE DE GA-ECG FRIO

[0099] <sup>69</sup>GaCl<sub>3</sub> (20 mg, 0,11mmol) em 0,2 ml H<sub>2</sub>O foi adicionado a uma solução de ECG (60 mg, 0,1mmol) em 0,5 ml H<sub>2</sub>O. O valor de pH foi ajustado para 4-5 com 0,1 N NaOH (50  $\mu$  l). A solução foi aquecida por 30 min a 60 °C. O produto bruto foi purificado por uma eluição de coluna de Sephadex com H<sub>2</sub>O to yield Ga-ECG. Após a liofilização, Ga-ECG foi obtido como sólido branco (52mg, 78,1%). RMN e espectrometria de massa e HPLC foram usados para confirmar a estrutura de <sup>69</sup>Ga-ECG.

[00100] RMN de frio <sup>69</sup>Ga-ECG foi <sup>1</sup>H RMN (D<sub>2</sub>O,  $\delta$ ): 2,94-3,38 (m, H 8) 3,43-3,65 (m, 4H), 3,50-3,80 (m, 10H), 3,92-4,02 (t, H 2), 4,23-

4,34(d, 2H), 5,15-5,34(d, 2H),  $^{13}\text{C}$  RMN( $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\delta$ ): 175,51 175,16, 95,55, 90,85, 90,67, 75,76, 74,90,73,55, 71,59, 70,71, 70,66, 70,10, 69,88, 60,72, 60,62, 56,72, 54,11, 23,53, 22,83, 22,16. Análise de Rádio-TLC e HPLC de pureza de  $^{68}\text{Ga}$ -ECG e  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -ECG foram gt;96% (FIGS. 2-4). HPLC de frio  $^{69}\text{Ga}$ -ECG foram usados para confirmar a estrutura de  $^{68}\text{Ga}$ -ECG (FIG. 3).

### EXEMPLO 3 - RADIOSÍTESE DE $^{68}\text{Ga}$ -ECG E $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DE ECG

[00101]  $^{68}\text{GaCl}_3$  foi obtido de um gerador  $^{68}\text{Ge} / ^{68}\text{Ga}$  (Eckert Ziegler, Valencia, CA) eluído com 0,1 de  $\text{NHCl}$ .  $^{68}\text{GaCl}_3$  (120  $\mu\text{l}$  de , 300  $\mu\text{Ci}$ ) foi adicionado à solução de ECG (1,2 mg) em 0,1 ml  $\text{H}_2\text{O}$  e o valor de pH foi ajustado para 4-5 com  $\text{NaHCO}_3$  (40  $\mu\text{l}$ , 0,1 N). A solução foi aquecida a  $60^\circ\text{C}$  durante 15 min. de sódio é ( $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ ) foi obtido do gerador  $^{99}\text{Mo} / ^{99\text{m}}\text{Tc}$  pela Covidien (Houston, TX). Radiosynthesis  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -ECG foi conseguido através da adição de  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -pertechnetato (40-50 mCi) no resíduo liofilizado de ECG (5 mg) e cloreto de estanho (II) ( $\text{SnCl}_2$ , 100 g de  $\mu$ ). A complexação de ECG com  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  foi realizada em pH 6,5. Determinou-se a pureza radioquímica do TLC (Waterman Nº 1, Aldrich-Sigma, St Louis, MO) eluído com solução salina. Cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), equipada com um detector NaI e detector UV (210 nm), foi realizada em uma coluna de fase reversa C-18 (C18-estende, Agilent, Santa Clara, CA) eluída com acetonitril/água (1:9, V/V) em uma taxa de fluxo de 0,5 ml/min. HPLC de frio  $^{69}\text{Ga}$ -ECG foi usado para confirmar a estrutura de  $^{68}\text{Ga}$ -ECG.

### EXEMPLO 4 - BIODISTRIBUIÇÃO DE RADIOMARCADORES EM RATOS PORTANDO MESOTELIOMA

[00102] 344 ratos Fisher Fêmea ( $150 \pm 25$  g) (Harlan Sprague-Dawley, Indianapolis, IN) ( $n = 3$  ratos/ponto de tempo) foram inoculados com células mesotelioma pleural maligno derivadas de linhagem celular IL- 45. Células tumorais ( $10^6$  células/rato) foram injetadas (i.m.) nas pernas traseiras. Estudos foram realizados 14 a 17 dias após a



inoculação, quando os tumores eram de aproximadamente 1 cm de diâmetro. Em estudos de distribuição de tecido, cada animal foi injetado (i.v., 10  $\mu$ Ci/rato,  $\mu$ 10 g/rato) com  $^{99m}\text{Tc}$ -ECG,  $^{68}\text{Ga}$ -ECG e  $^{18}\text{F}$ -FDG. Os ratos foram sacrificados em 0,5-4 hrs. Os tecidos selecionados foram extirpados, pesados e contados pela radioatividade usando um contador gama (Packard Instruments, Downers Grove, IL). A biodistribuição do marcador em cada amostra foi calculada como porcentagem da dose injetada por grama de peso úmido de tecido (%ID/g).

[00103] Absorção tumor e tecido (%ID/g) de  $^{68}\text{Ga}$ -ECG,  $^{99m}\text{Tc}$ -ECG e  $^{18}\text{F}$ -FDG são mostrados nas Tabelas 1-3. A maior absorção de tumor  $^{99m}\text{Tc}$ -ECG é 0,47 em 30 min pós injeção e declinou a 0,08 em 240 min pós injeção. Captação de tumor (%ID/g), tumor/pulmão, tumor/sangue e tumor/músculo em contagem de proporções de densidade para  $^{99m}\text{Tc}$ -ECG (30-240 min) foram  $0,47 \pm 0,06$  a  $0,08 \pm 0,01$ ;  $0,71 \pm 0,07$  a  $0,85 \pm 0,04$ ;  $0,47 \pm 0,03$  a  $0,51 \pm 0,01$ , e  $3,49 \pm 0,24$  a  $5,06 \pm 0,25$ ; por  $^{68}\text{Ga}$ -ECG (15-60 min) foram  $0,70 \pm 0,06$  a  $0,92 \pm 0,08$ ;  $0,64 \pm 0,05$  a  $1,15 \pm 0,08$ ;  $0,42 \pm 0,03$  a  $0,67 \pm 0,07$ , a  $3,84 \pm 0,52$  a  $7,00 \pm 1,42$ ; por FDG (30-180 min) foram  $1,86 \pm 0,22$  a  $1,38 \pm 0,35$ ;  $3,18 \pm 0,44$  a  $2,92 \pm 0,34$ ,  $4,19 \pm 0,44$  a  $19,41 \pm 2,05$  e  $5,75 \pm 2,55$  a  $3,33 \pm 0,65$ , respectivamente. Maior absorção renal foi observada tanto para  $^{68}\text{Ga}$ -ECG e  $^{99m}\text{Tc}$  grupos ECG, presumível porque conjugados EC e EC podem interagir com túbulos renais no rim (Yang et al., 2003).

#### EXEMPLO 5 - ESTUDOS DE IMAGEAMENTO CINTILOGRÁFICO

[00104] 344 ratos Fischer Fêmea ( $150 \pm 25$  g) portando mesotelioma pleural maligno (nas pernas traseiras) derivado de linhagem celular IL-45 foram utilizados para estudos de imageamento. Estudos foram realizados 14 a 17 dias após a inoculação, quando os tumores eram de aproximadamente 1 cm de diâmetro. Imagens cintilográficas foram obtidas de um micro-PET (Inveon) incorporadas na aquisição de dados

PET/CT de coordenadas pÓrticas , ou de uma câmara de M-gama (Siemens Medical Systems, Inc., Hoffman Estates, IL) equipado com colimador de orifício paralelo de baixa energia. Cada animal recebeu administração com  $^{99m}\text{Tc}$ -ECG (300  $\mu\text{Ci}$ /rato, iv),  $^{68}\text{Ga}$ -ECG e  $^{18}\text{F}$ -FDG (400  $\mu\text{Ci}$ /rato, iv), e as imagens foram obtidas em 0,5-4 hrs. Para demonstrar  $^{68}\text{Ga}$ -ECG pode ser usado para terapia guiada por imagem, os mesmos ratos portando mesotelioma ( $n = 3$ ) com o volume do tumor 1,5 cm foram tratados com paclitaxel (injeção única de 20 mg/kg, iv,). Antes do tratamento e tratamento pós-paclitaxel no dia 7, os ratos portando tumor foram imageados com  $^{68}\text{Ga}$ -ECG. Regiões de interesse (ROI) delineadas por computador (contagens por pixel) foram usadas para determinar as proporções de densidade de contagem de tumor-fundo para  $^{99m}\text{Tc}$ -ECG. Regiões de interesse (ROI) delineadas por computador (contagens por pixel) para o tumor e músculo no intervalo de tempo correspondente foram usados para gerar um gráfico dinâmico. Representação gráfica dinâmica foi de 0 a 45 minutos. Paclitaxel foi selecionado porque produziu efeitos antiproliferativos através da inibição dos transportadores de glicose (Glut-1) em estudos de linha celular (Rodrigues, *et al.* 2007). Além disso, foi relatado que mesotelioma responde ao tratamento de paclitaxel no modelo animal (Schulz, *et al.* 2011).

[00105] Imagens cintilográficas de ratos que receberam administração  $^{68}\text{Ga}$ -ECG,  $^{99m}\text{Tc}$ -ECG e  $^{18}\text{F}$ -FDG mostraram que tumores podem ser claramente visualizadas em 0,5-4 hrs (FIGS. 5-7). Representação gráfica dinâmica de absorção de tumor com  $^{68}\text{Ga}$ -ECG e  $^{18}\text{F}$ -FDG mostrou padrão de transporte similar (FIG. 5).  $^{68}\text{Ga}$ -ECG foi capaz de monitorar a resposta de tratamento paclitaxel nos mesmos ratos portando mesotelioma (FIG. 6). Dois ratos recebendo  $^{99m}\text{Tc}$ -ECG (meio e direita) foram selecionados aleatoriamente para comparar ao rato recebendo  $^{99m}\text{Tc}$ -EC (esquerda) sob o mesmo painel de imagem. Tumor

em  $^{99m}\text{Tc}$ -ECG mostrou muito maior absorção do que  $^{99m}\text{Tc}$ -EC (de controle) em 1 e 2 hrs (FIG. 7).

[00106] Em resumo, uma síntese eficiente de ECG foi alcançada com alto rendimento.  $^{68}\text{Ga}$ -ECG e  $^{99m}\text{Tc}$ -ECG foram preparados com alta pureza radioquímica. Biodistribuição e estudos de imageamento planares demonstraram a distribuição farmacocinética e viabilidade do uso de  $^{68}\text{Ga}$ -ECG e  $^{99m}\text{Tc}$ -ECG para imagear mesotelioma.  $^{68}\text{Ga}$ -ECG e  $^{99m}\text{Tc}$ -ECG mostrou um aumento da absorção no mesotelioma no modelo testado, indicando que eles são possíveis para avaliar o volume do tumor.  $^{68}\text{Ga}$ -ECG e  $^{99m}\text{Tc}$ -ECG pode ser útil para triagem, diagnóstico, estadiamento e avaliar a eficácia do tratamento em respeito a todos os tipos de câncer.

#### EXEMPLO 6 – FABRICAÇÃO DE KIT EC-G

[00107] Um único kit EC-G foi fabricado pela dissolução de 1,0 mg de EC-G em 0,1 mL de água. Para isso, 1 mg de ácido L-ascórbico em 0,1 mL de água, 0,5 mg de neomicina em 0,1 mL, 0,5 mg L-cisteína e, 0,1 mL de 1 g/mL de solução de cloreto de estanho (II) foram adicionados. O produto foi liofilizado para um único kit frio.  $^{99m}\text{Tc}$ -EC-G feito usando o kit foi analisado por cromatografia de camada fina instantânea utilizando soro fisiológico como uma fase móvel. Os resultados indicaram a mesma retenção para o produto do kit, bem como um produto padrão  $^{99m}\text{Tc}$ -EC-G (FIG. 16). O produto de kit e produto padrão também foram analisados por HPLC usando  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$  (9:1) como um eluente com uma taxa de fluxo de 0,50 mL/min (FIGS. 17 and 18). A absorção do produto de kit e produto padrão foram analisadas para absorção em 13762 células de tumor mamário de rato. O produto kit foi encontrado para ter absorção maior que 5 vezes do que o produto padrão (FIG. 19)

#### LISTAGEM DE REFERÊNCIAS

[00108] As seguintes referências, à medida que eles fornecem exem-

plares, processuais ou outros detalhes complementares aos estabelecidos, são especificamente incorporadas neste documento por referência.

U.S. Publn. 2008/0107198

Alberico *et al.*, *Surg. Oncol. Clin. N. Am.*, 13(1):13-35, 2004.

Bodansky, In: *Peptide Chemistry*, 2<sup>nd</sup> Ed., Springer-Verlag, New York, 1993.

Grant, In: *Synthetic Peptides*, Freeman & Co., New York, 1992.

Green and Wuts, *Protective Groups in organic Synthesis*, 3<sup>a</sup> Ed. Wiley, NY, 1999.

Henson *et al.*, *Am. J. Neuroradiol.*, 25(6):969-972, 2004.

Kundra *et al.*, *J. Nucl. Med.*, 43(3):406-412, 2002.

Rastogi *et al.*, *Cancer Lett.*, 257(2):244-251, 2007.

Remington's Pharmaceutical Sciences, 18<sup>a</sup> Ed. Mack Printing Company, 1289-1329, 1990.

Saha *et al.*, *Semin. Nucl. Med.*, 24(4):324-349, 1994.

Schulz *et al.*, *Ann. Thorac. Surg.*, 92(6):2007-2013, 2011.

Strunk and Schild, *Eur. Radiol.*, 14(6):1055-1062, 2004.

Yang *et al.*, *Radiology*, 226:465-473, 2003.

## REIVINDICAÇÕES

1. Método de preparação de um conjugado de tiazolidina-açúcar, caracterizado pelo fato de que compreende um açúcar de amino com um ácido tiazolidina carboxílico, produzindo assim o conjugado de tiazolidina-açúcar.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que ainda compreende a redução do conjugado de tiazolidina-açúcar com um agente redutor compreendendo um metal alcalino e uma fonte de elétrons para desse modo fornecer um conjugado de etilenodicisteína-açúcar.

3. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o açúcar de amino é glucosamina ou cloridrato de 1,3,4,6-tetra-O-acetil-2-amino- $\alpha$ -D-glicopirranose.

4. Método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que ainda compreende a quelação de um íon metálico ao conjugado de etilenodicisteína-açúcar para gerar um conjugado de etilenodicisteína(EC)-açúcar rotulado com íon metálico.

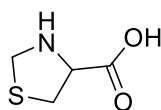
5. Método de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que o íon metálico é selecionado do grupo de íons de metal que consiste em um íon de tecnécio, um íon de estanho, um íon de cobre, um íon de índio, um íon de tálio, um íon de gálio, um íon de arsênico, um íon de rênio, um íon de hólmio, um íon de ítrio, um íon de samário, um íon de selênio, um íon de estrôncio, um íon de gadolínio, um íon de bismuto, um íon de ferro, um íon de manganês, um íon de lutécio, um íon de cobalto, um íon de platina, um íon de cálcio e um íon de ródio.

6. Método de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que o íon metálico é um radionuclídeo; preferivelmente em que o radionuclídeo é selecionado do grupo consistindo em  $^{99m}\text{Tc}$ ,  $^{117m}\text{Sn}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{89}\text{Sr}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,

$^{183}\text{Gd}$ ,  $^{59}\text{Fe}$ ,  $^{225}\text{Ac}$ ,  $^{221}\text{Bi}$ ,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{45}\text{Ti}$ ,  $^{60}\text{Cu}$ ,  $^{61}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{64}\text{Cu}$  e  $^{62}\text{Cu}$  ou um metal não radiativo selecionado de  $^{187}\text{Re}$ .

7. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que ácido tiazolidina carboxílico é um ácido tiazolidina carboxílico desprotegido.

8. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o ácido tiazolidina carboxílico é



9. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende ainda um agente de ligação.

10. Composição caracterizada pelo fato de que compreende um conjugado de etilenodicisteína-açúcar ou conjugado de etilenodicisteína-açúcar rotulado com íon metálico e neomicina.

11. Composição de acordo com a reivindicação 10, caracterizada pelo fato de que compreende cerca de 0,1 mg a cerca de 1,0 mg de neomicina por 1 mg de conjugado de etilenodicisteína-açúcar.

12. Composição de acordo com a reivindicação 10, caracterizada pelo fato de que ainda compreende um antioxidante.

13. Composição de acordo com a reivindicação 10, caracterizada pelo fato de que ainda compreende ácido ascórbico, cisteína ou cloreto de estanho(II).

14. Composição de acordo com a reivindicação 10, caracterizada pelo fato de que compreende:

(a) cerca de 0,5 a 2,0 mg de ácido ascórbico per 1 mg de conjugado de etilenodicisteína-açúcar;

(b) cerca de 0,1 a 1,0 mg de cisteína per 1 mg de conjugado de etilenodicisteína-açúcar;

(c) cerca de 0,05 a 0,5 mg de cloreto de estanho(II) per 1 mg de conjugado de etilenodicisteína-açúcar.

15. Composição de acordo com a reivindicação 10, caracterizada pelo fato de que a composição é liofilizada.

16. Uso de conjugado de etilenodicisteína-açúcar e/ou e neomicina, caracterizado pelo fato de que é para preparação de uma composição para formação de imagens dentro de um sítio, de diagnóstico de uma doença, ou tratamento de uma doença.

17. Método de formação de imagem de um sítio em um indivíduo caracterizado pelo fato de que o conjugado de etilenodicisteína-açúcar rotulado com íon metálico e neomicina foi administrado no referido indivíduo, em que o método compreende formação de imagens do sítio.

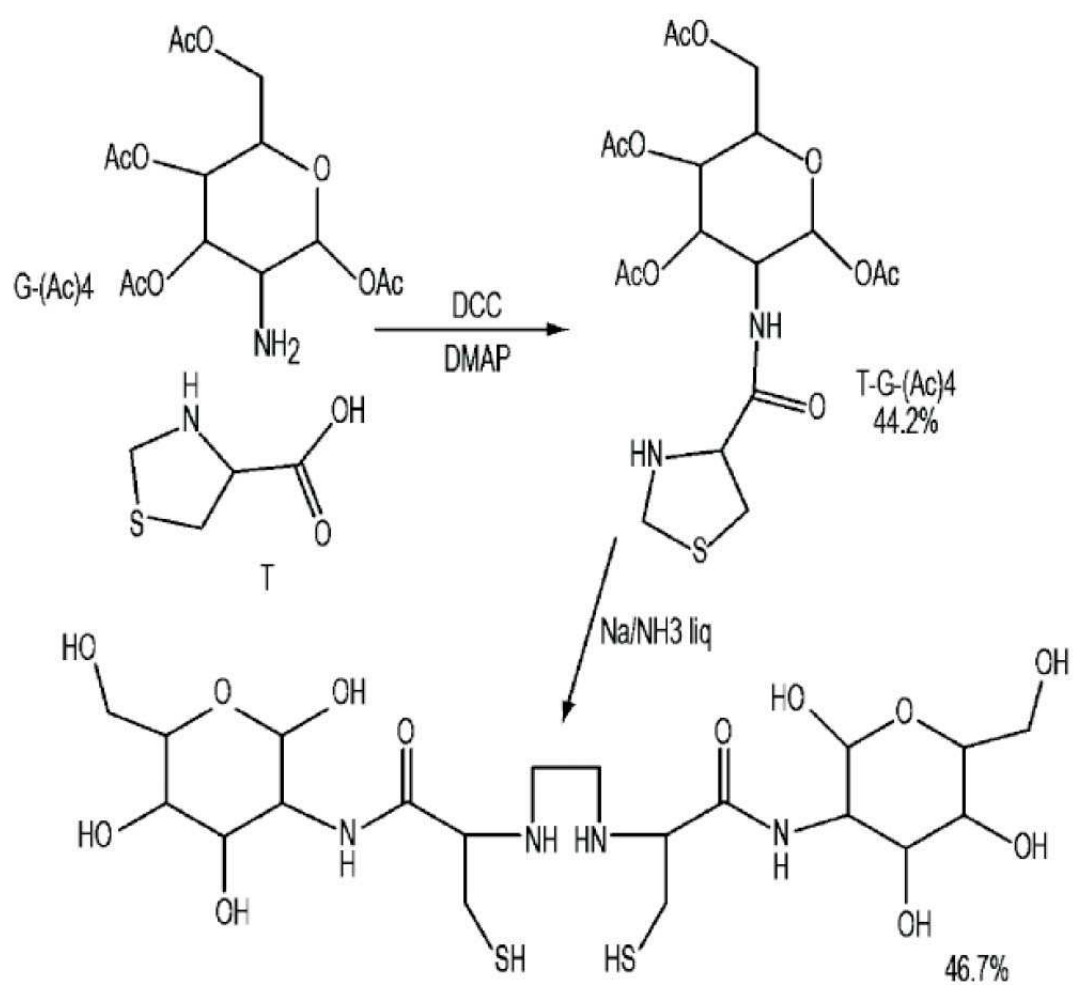


FIG. 1



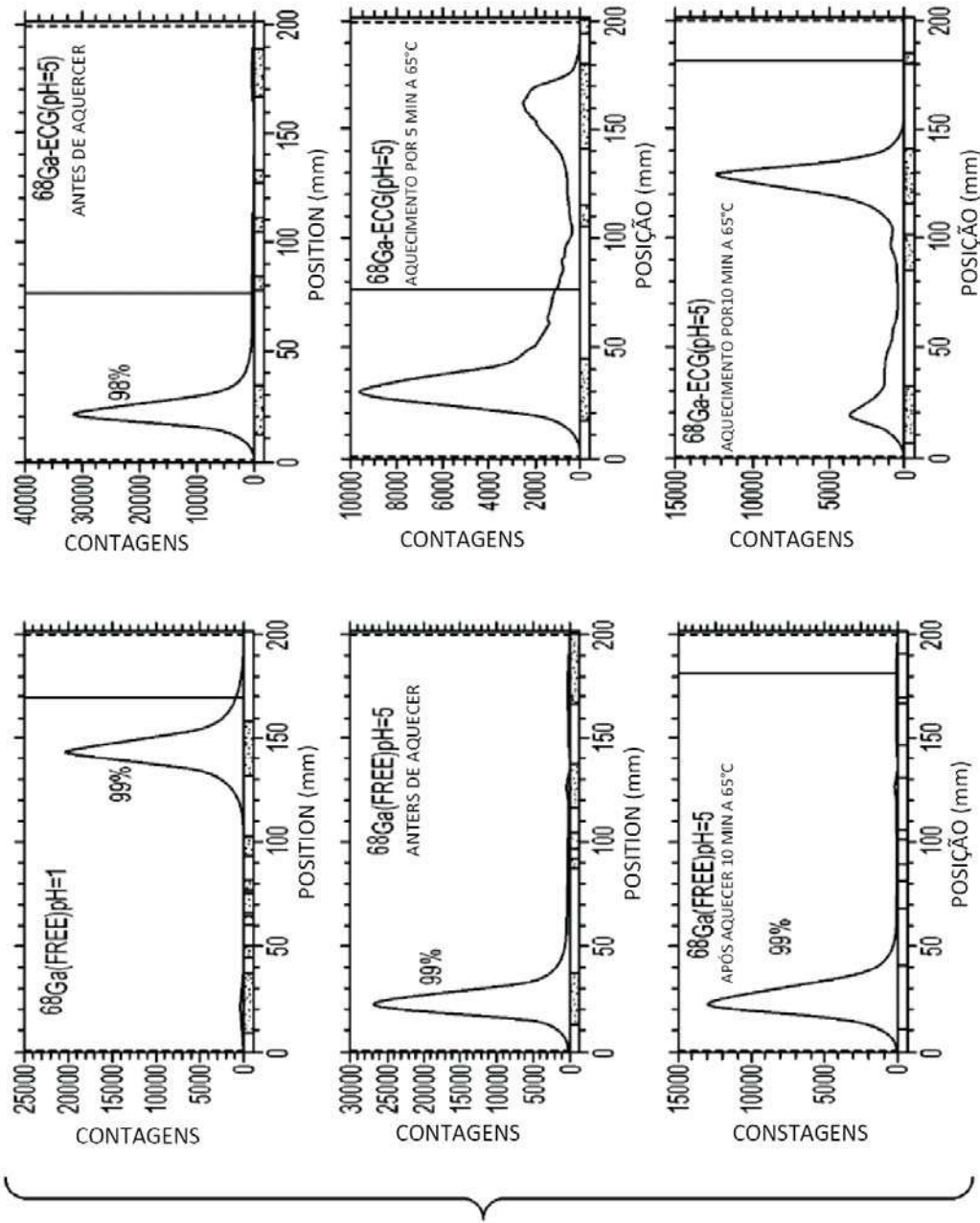


FIG. 2

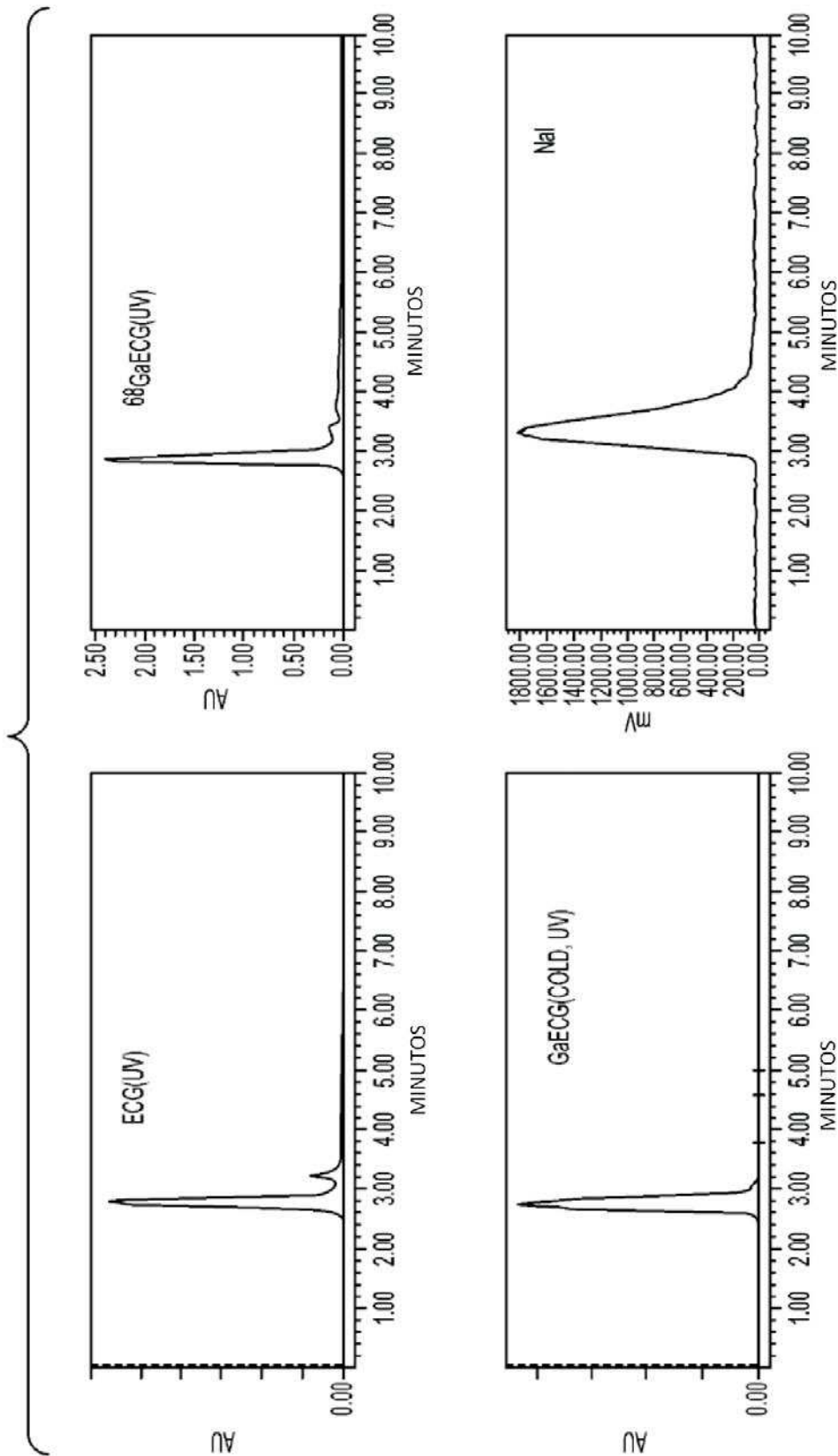


FIG. 3

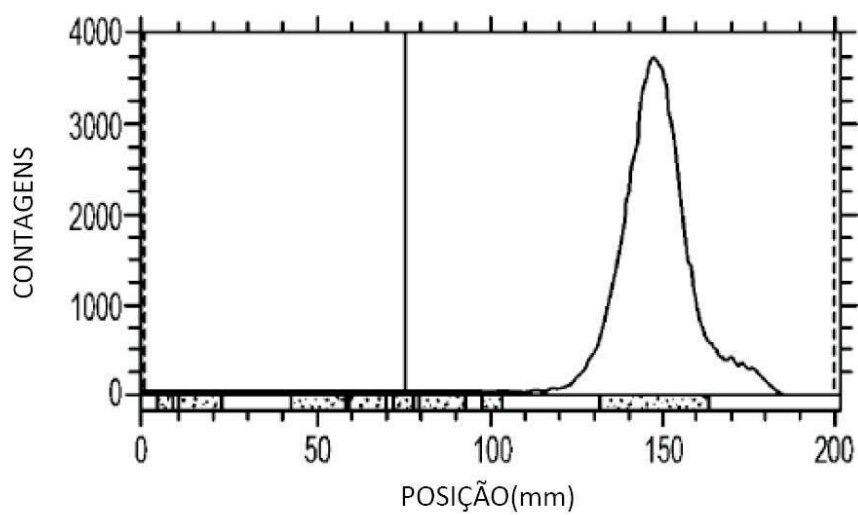


FIG. 4A

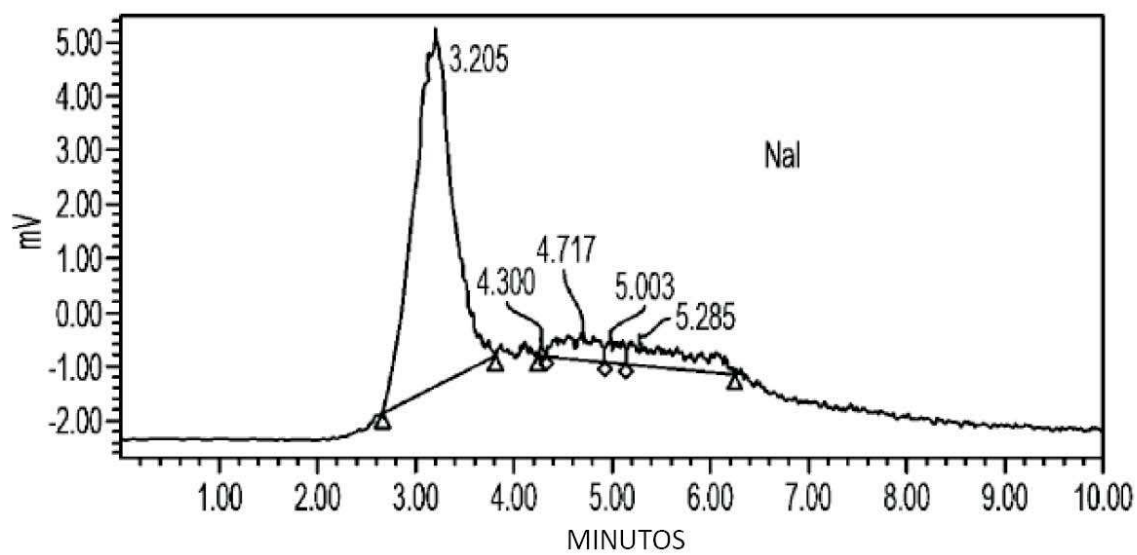


FIG. 4B

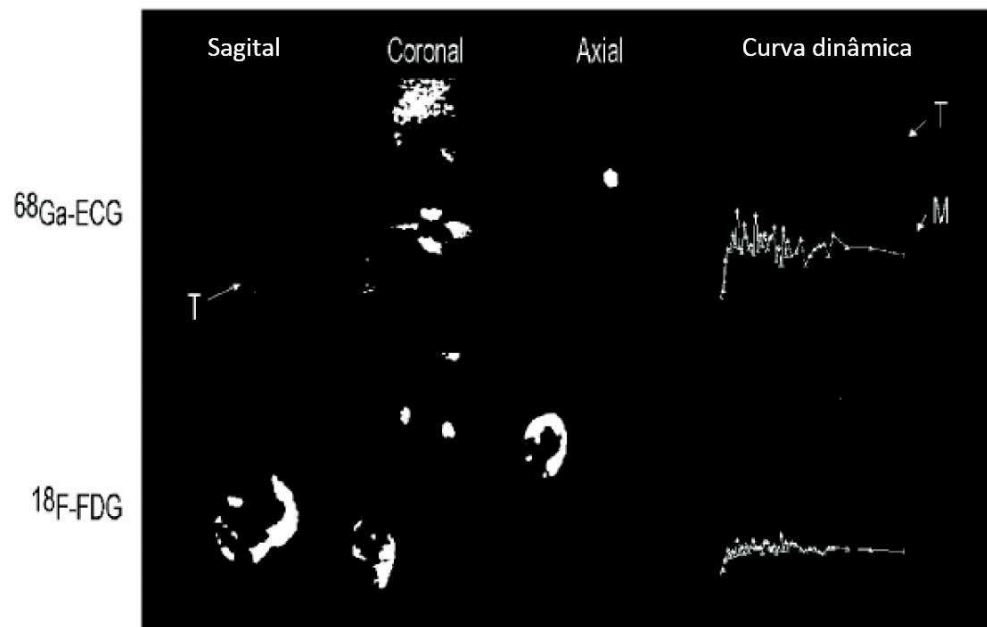


FIG. 5

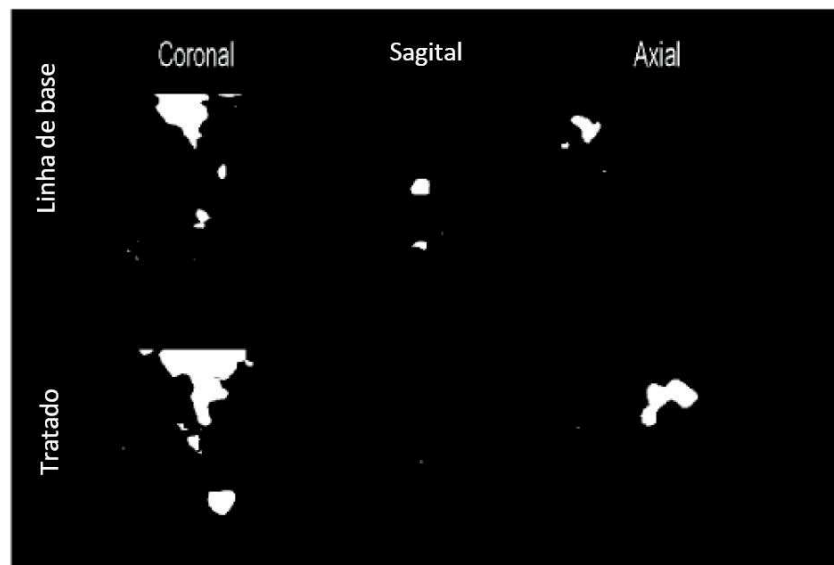


FIG. 6

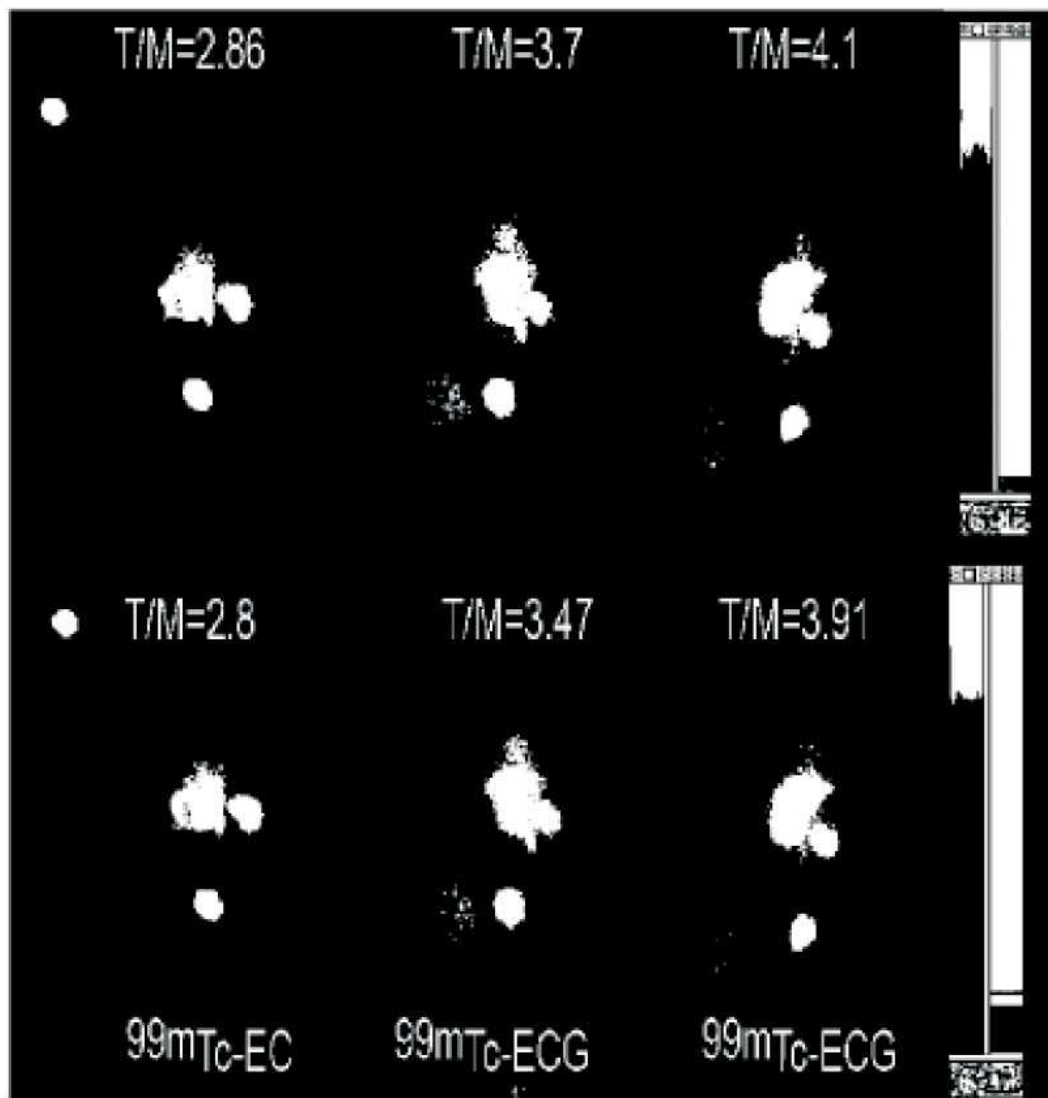


FIG. 7

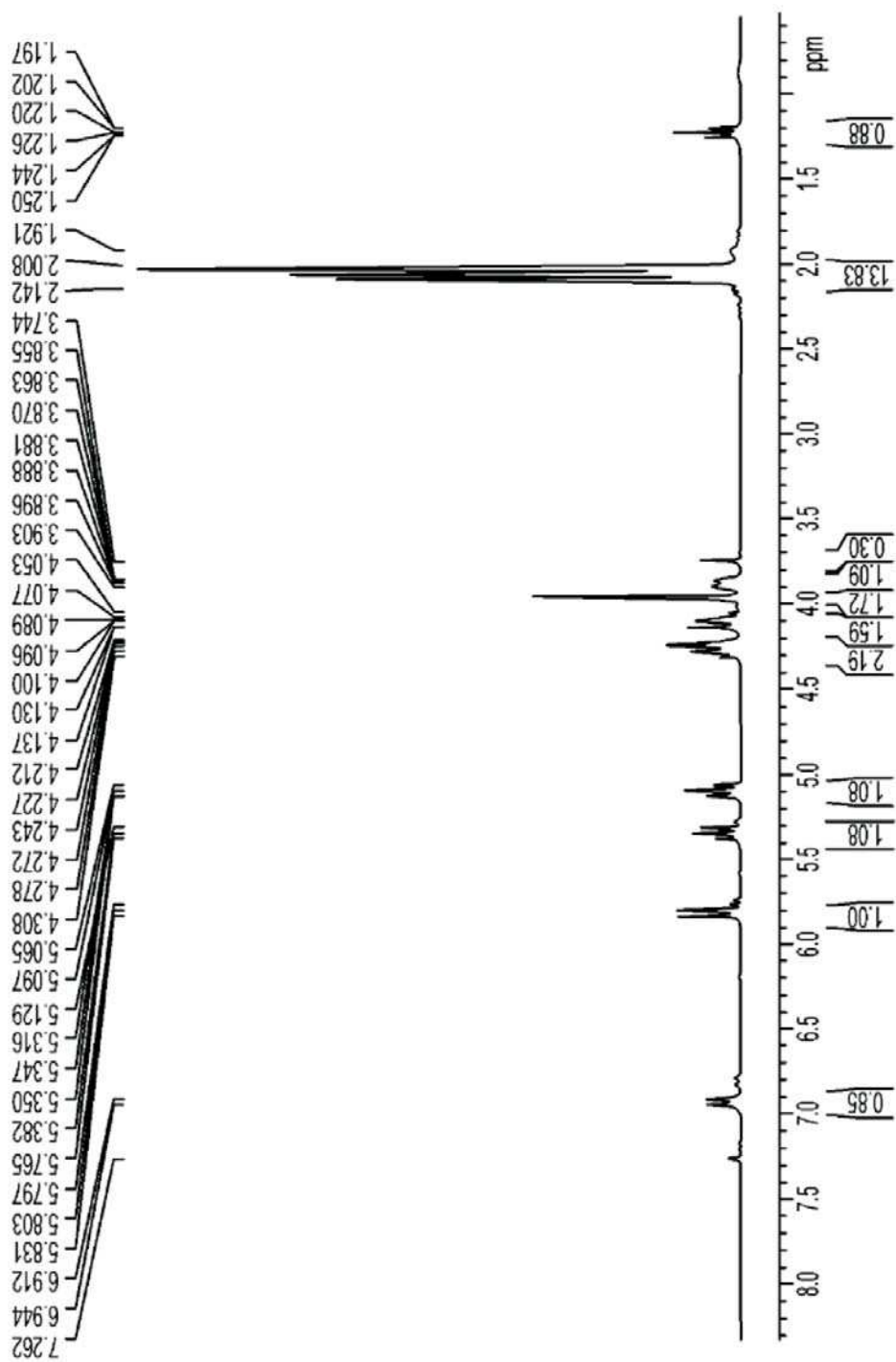


FIG. 8

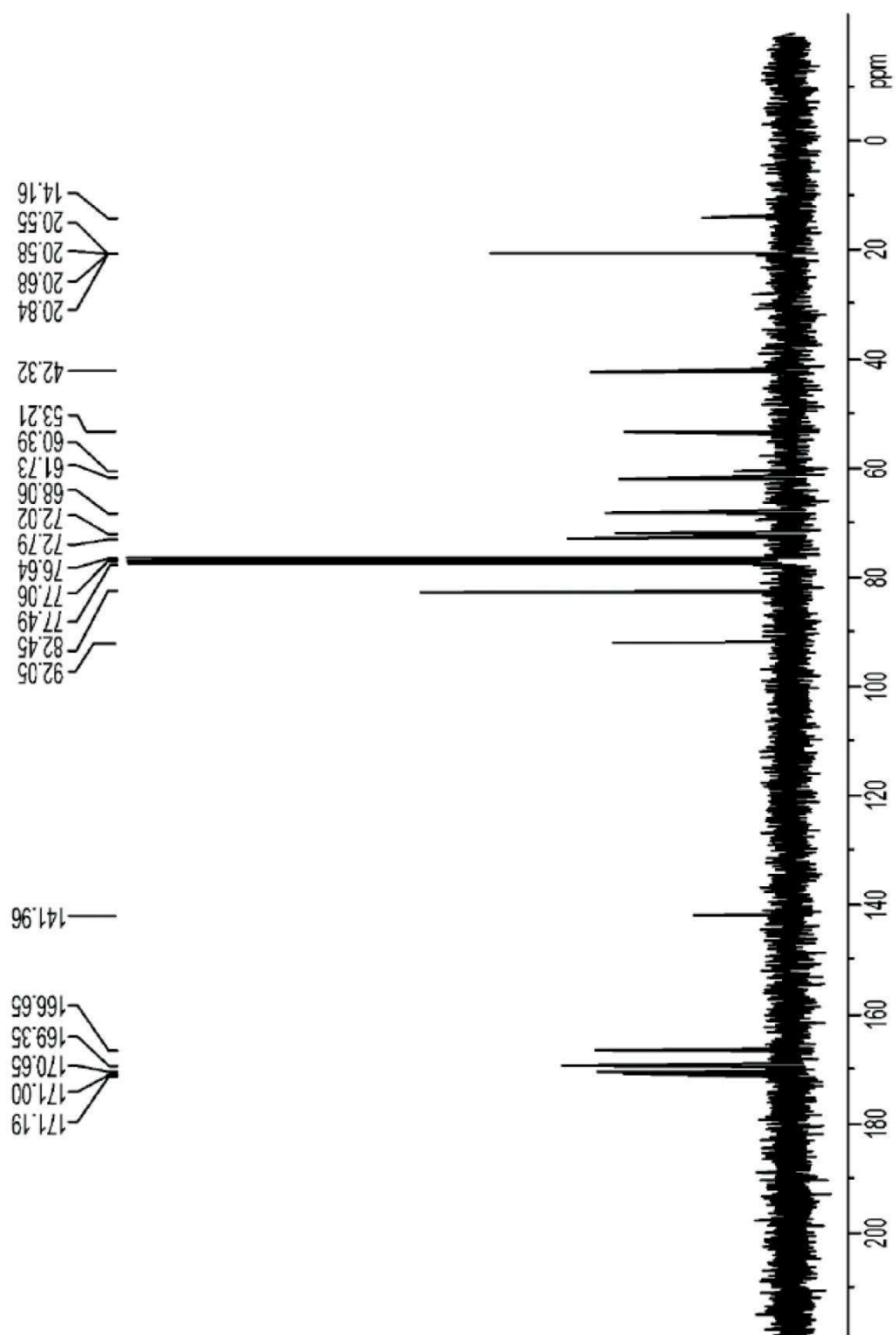


FIG. 9

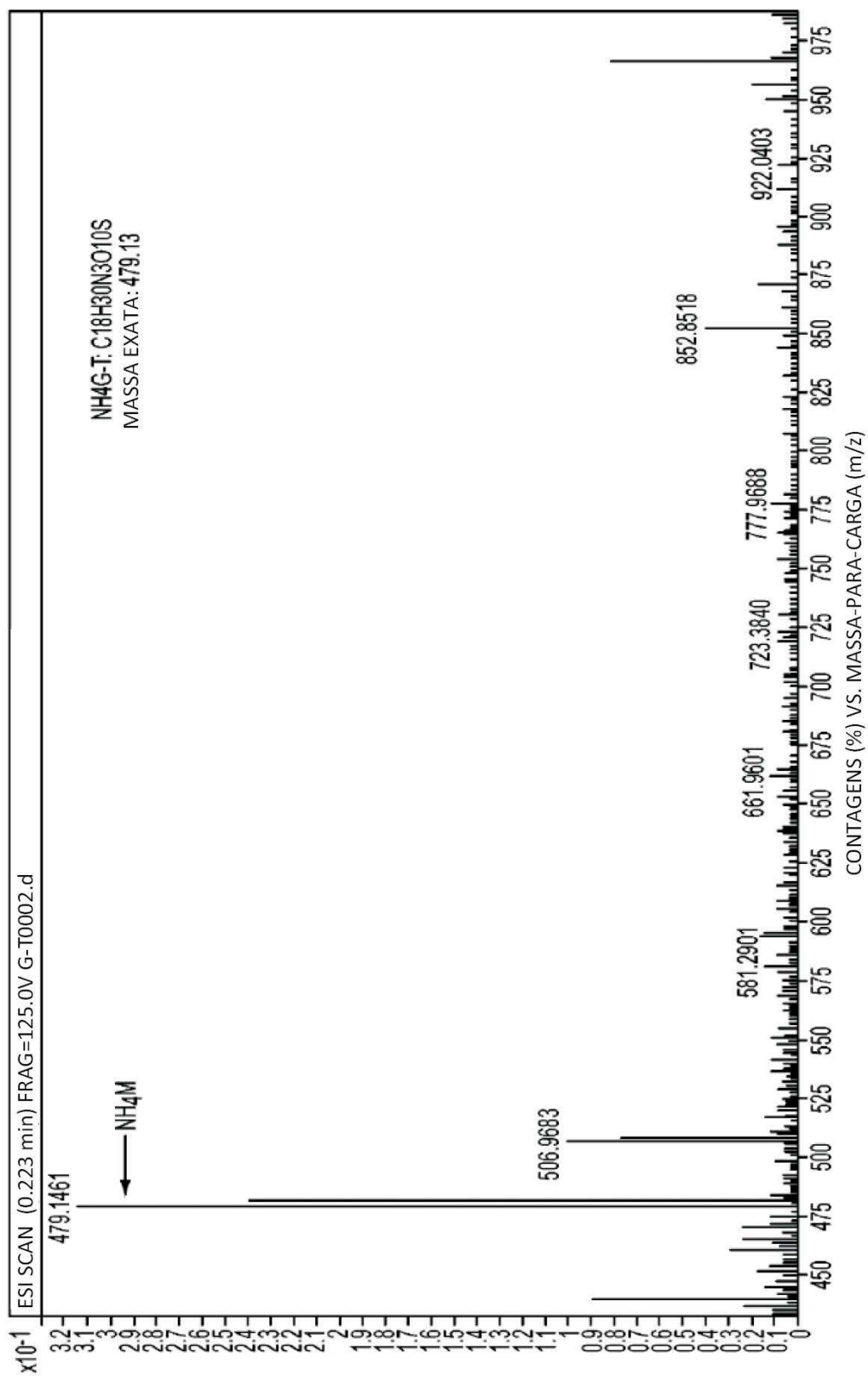


FIG. 10



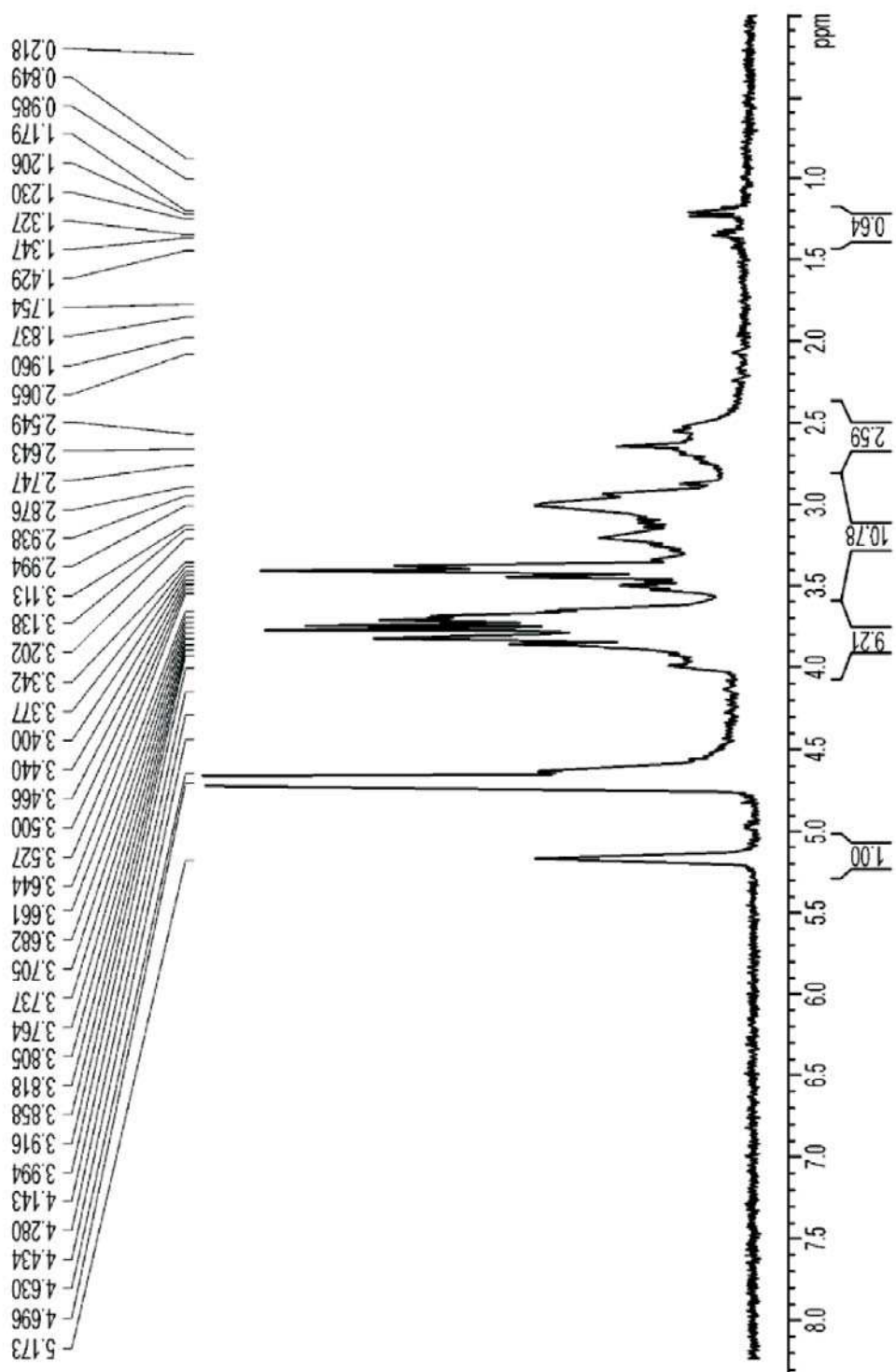


FIG. 11

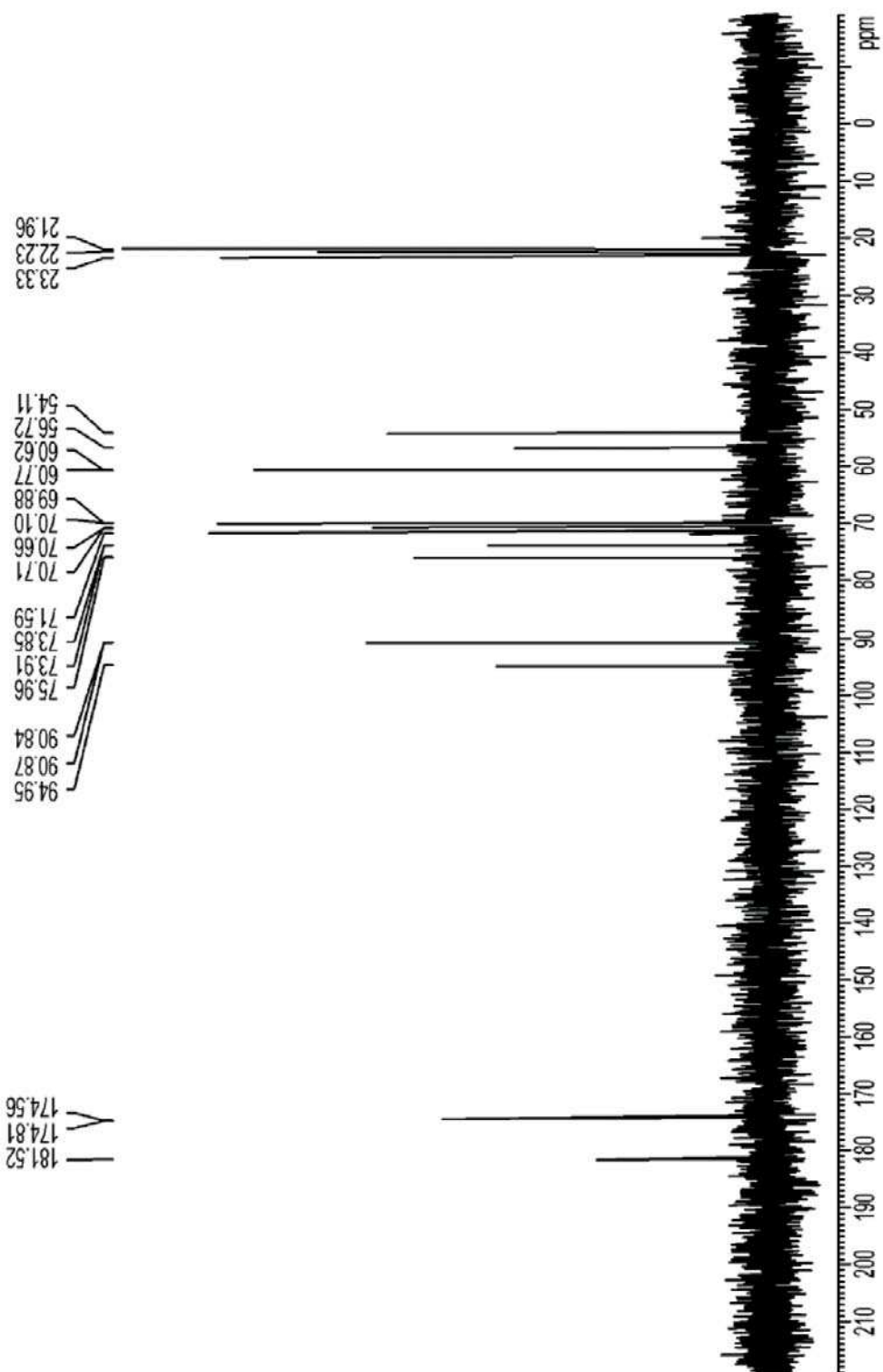


FIG. 12

Nome da amostra: **ECOG-Z1**  
 Vol Inj: **0.2**  
 Nome do arquivo DATA: **ECOGZ1LC2-r002a.d**

Posição: **zhp1cmu/linode25.m**  
 Posição Inj.: **zhp1cmu/linode25.m**  
 Método ACQ: **zhp1cmu/linode25.m**

Instrumento 1: **Amostra**  
 Nome do Usuário: **Status de Calibração ISM**  
 Sucesso: **5/26/2010 10:20:43 AM**

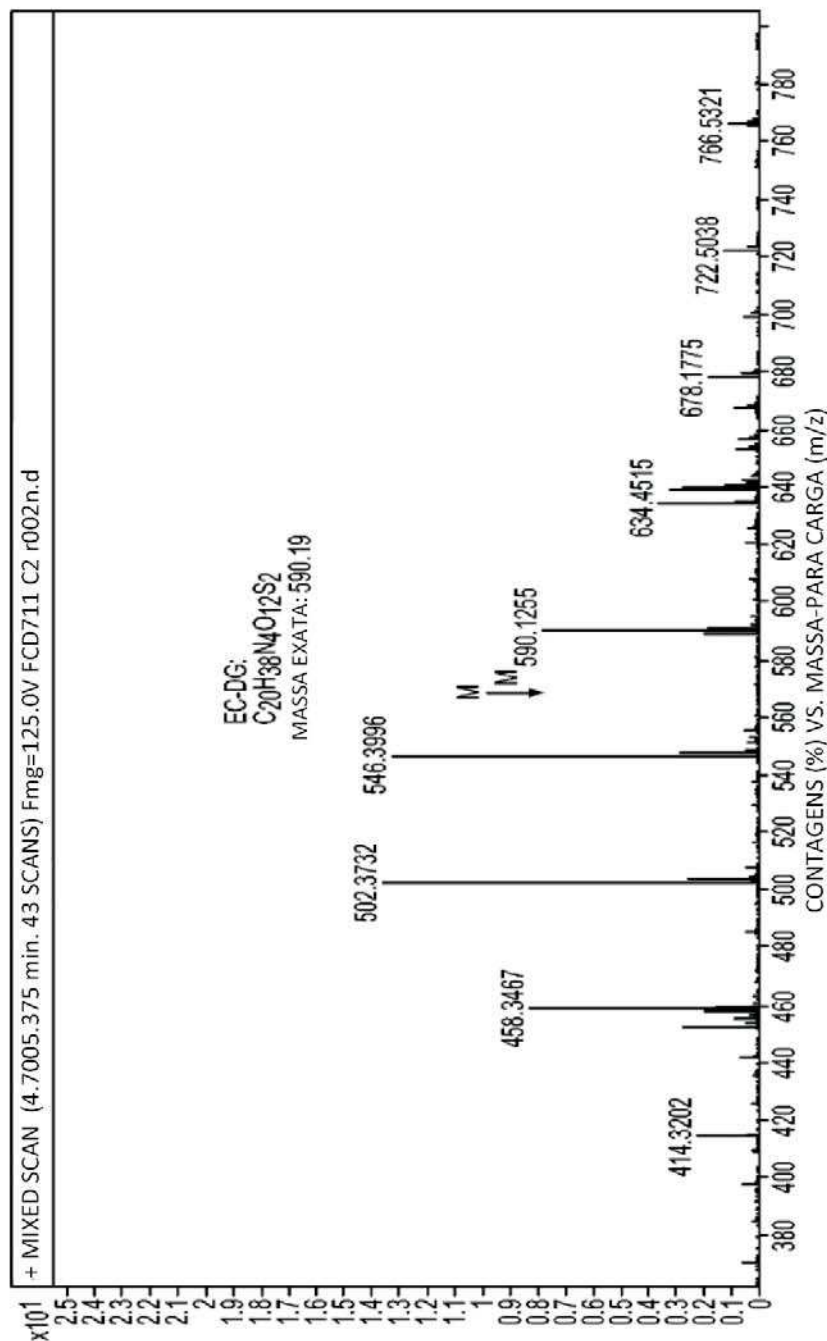


FIG. 13

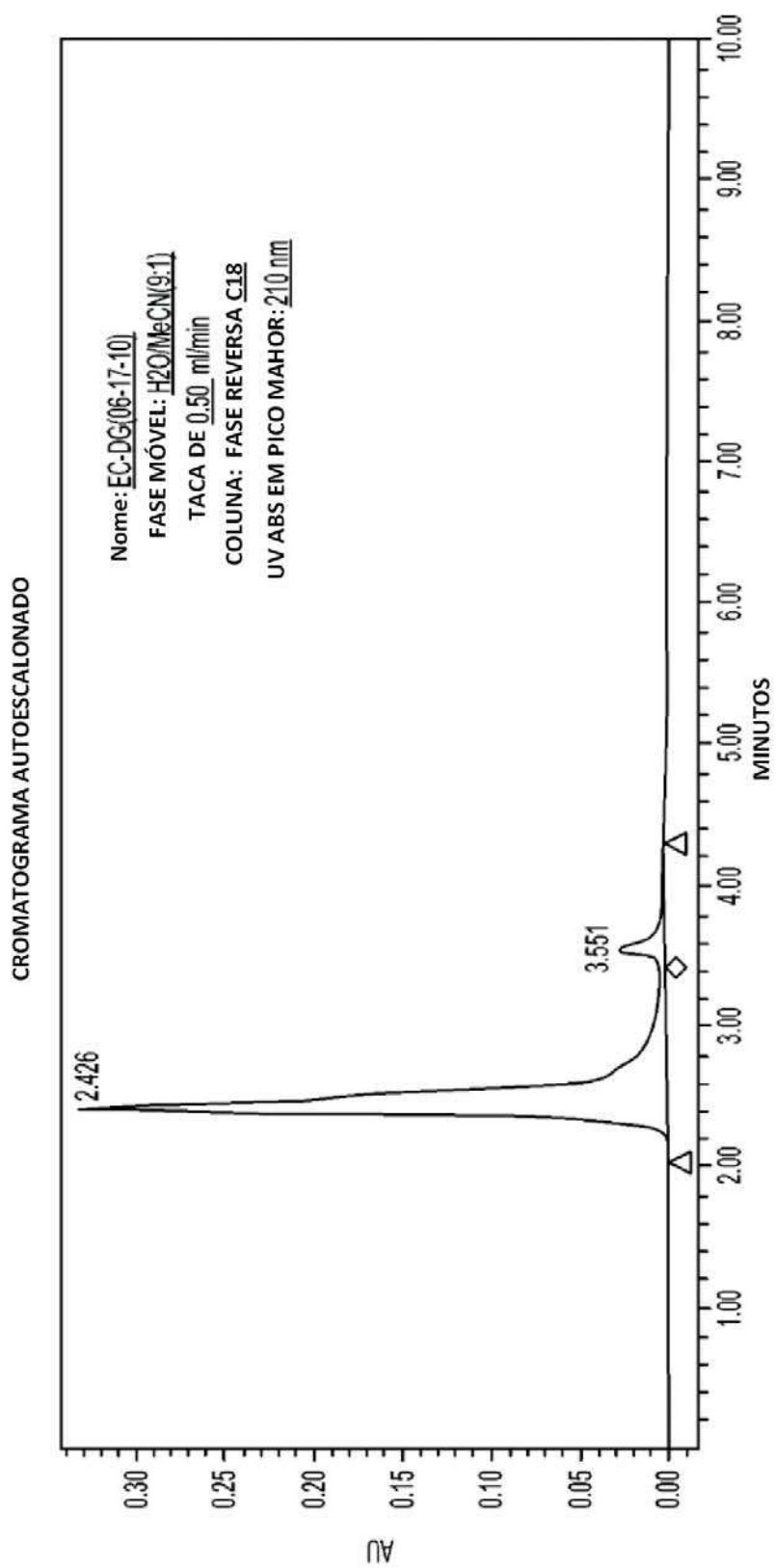


FIG. 14

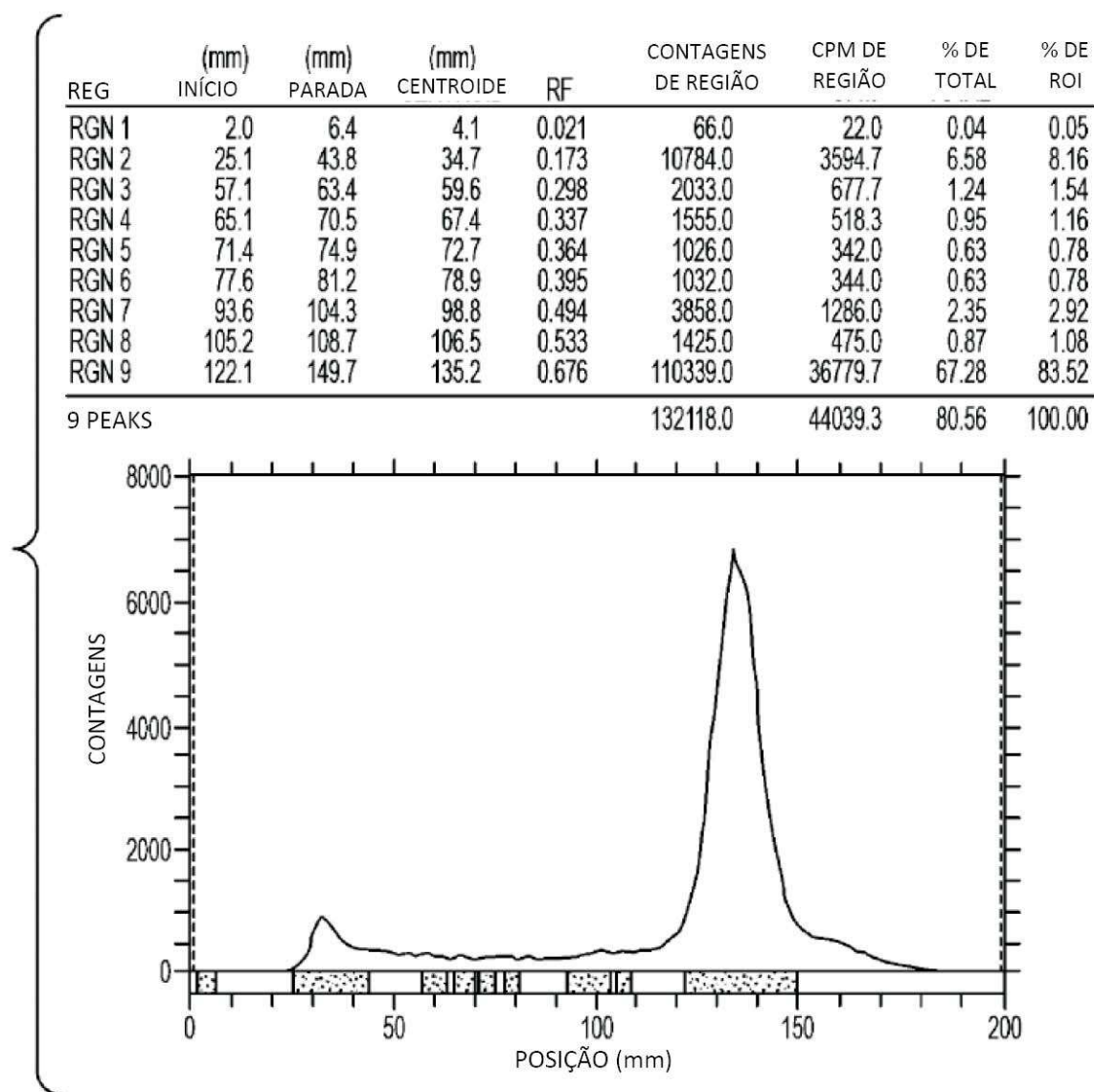


FIG. 15

Método: o QuickStar Arquivo: 130322-1217.R001

File: 130322-1149.R001

## Comentarios

## Comments

<b>Parâmetros de Análise</b>	
Sig. Substrato:	Nonhum
Normalização:	Nonhum
Conc. Total	52313.0 (26456.5 CPM)
Cont. de argônio total:	527.48
Origem:	0.0 mm
Frente:	200.0 mm
Região:	0.0-200.0 mm

Six Substrator:	None	Origiem:	0.0 mm
Normalizagao:	None	Frente:	200.0 mm
Contagem total:	139660.0	Replac:	0.0-200.0 mm

Cont de arquivo total:

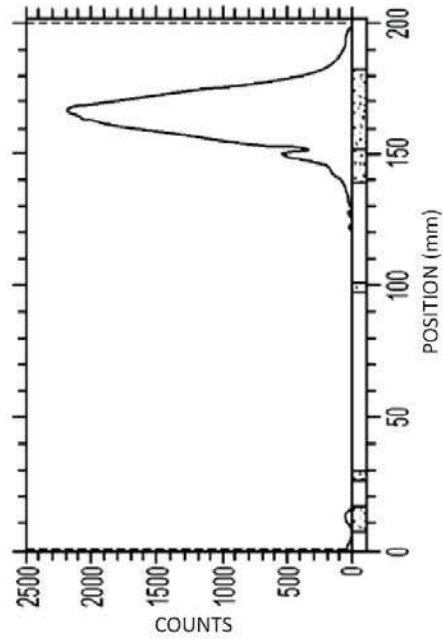
Análise de Regressão	
Definição	Busca de Bico
Peak slope	2.0 cont/mm
Largura Mm:	<b>2.3mm</b>
Ret Mm de Total:	<b>0.0%</b>

### Análise da Região

Definição	Buça de pico
Decividade de pico	2.0 cont mm
Largura Min	2.3mm
Pct Min. Do Total:	0.0%

Reg	1	2	3	4	5	Peaks		
Pet Min de Total:	82	180	125	063	272.0	135.0	0.52	0.56
Incio	364	312	380	343	56.0	33.5	0.10	0.14
Fimdo	152.3	147.3	073.6	379.0	189.7	7.26	0.11	0.11
Conte de Regiao	152.3	182.6	165.9	085.8	452.0	225.2	85.1	91.41
CPM de Regiao						2435.5	93.11	100.00
% de Total								
% de ROI								

5 Peaks



página 1

## Comments

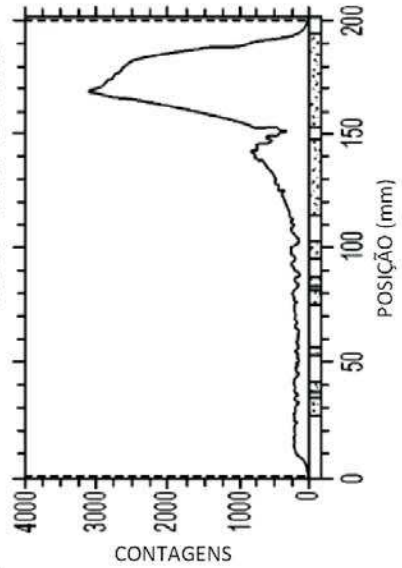
Address	None	Origin:	0.0 mm
SVS Subtractor	None	Front:	200.0 mm
Normalizing		Rear:	0.0-200.0 mm
Contingency total			
			139650.0 69630.0 0 C PM

### Análise da Região

Definição	Buça de pico
Decividade de pico	2.0 cont mm
Largura Min	2.3mm
Pct Min. Do Total:	0.0%

Reg	(mm)	(mm)	(mm)	RF	Cont. de região	COM de Região	% de Total	ROI
1	260	32	28,6	0,143	1540,0	770,0	1,0	1,27
2	300	37	34,0	0,170	1071,0	535,5	0,71	0,88
3	322	46	42,9	0,209	1314,0	657,0	0,94	1,06
4	346	55	51,1	0,255	1071,0	535,5	0,71	0,88
5	369	64	59,5	0,297	909,0	454,5	0,60	0,73
6	393	73	67,7	0,338	771,0	385,5	0,51	0,63
7	417	82	75,9	0,379	654,0	327,0	0,43	0,54
8	441	91	84,2	0,419	558,0	279,0	0,36	0,45
9	465	100	92,4	0,459	483,0	241,5	0,31	0,39
10	489	109	100,6	0,500	417,0	208,5	0,27	0,34
11	513	118	108,8	0,540	360,0	180,0	0,23	0,29
12	537	127	117,0	0,580	315,0	157,5	0,20	0,26
13	561	136	125,2	0,621	279,0	139,5	0,18	0,23
14	585	145	133,4	0,661	243,0	121,5	0,16	0,21
15	609	154	141,6	0,702	207,0	103,5	0,14	0,18
16	633	163	149,7	0,742	180,0	90,0	0,12	0,16
17	657	172	157,9	0,783	153,0	76,5	0,10	0,13
18	681	181	166,0	0,823	126,0	63,0	0,08	0,11
19	705	190	174,2	0,864	103,5	51,75	0,07	0,09
20	729	199	182,3	0,904	90,9	45,45	0,06	0,08
21	753	208	190,4	0,945	77,1	38,55	0,05	0,07
22	777	217	198,5	0,985	65,4	32,7	0,04	0,06
23	801	226	206,6	1,026	53,55	26,775	0,03	0,05
24	825	235	214,7	1,066	45,45	22,725	0,03	0,04
25	849	244	222,8	1,107	38,55	19,275	0,02	0,03
26	873	253	230,8	1,147	31,5	15,75	0,02	0,03
27	897	262	238,9	1,188	24,3	12,15	0,01	0,02
28	921	271	246,9	1,228	20,7	10,35	0,01	0,02
29	945	280	255,0	1,269	18,0	9,0	0,01	0,02
30	969	289	263,0	1,309	15,3	7,65	0,01	0,02
31	993	298	271,1	1,350	12,6	6,3	0,01	0,02
32	1017	307	279,2	1,390	10,35	5,175	0,01	0,02
33	1041	316	287,2	1,431	9,09	4,545	0,01	0,02
34	1065	325	295,3	1,471	7,71	3,855	0,01	0,02
35	1089	334	303,3	1,512	6,54	3,27	0,01	0,02
36	1113	343	311,4	1,552	5,58	2,79	0,01	0,02
37	1137	352	319,4	1,593	4,83	2,415	0,01	0,02
38	1161	361	327,5	1,633	4,17	2,085	0,01	0,02
39	1185	370	335,5	1,674	3,60	1,80	0,01	0,02
40	1209	379	343,6	1,714	3,15	1,575	0,01	0,02
41	1233	388	351,6	1,755	2,79	1,395	0,01	0,02
42	1257	397	359,7	1,795	2,43	1,2	0,01	0,02

0 picas



página 1

FIG. 16

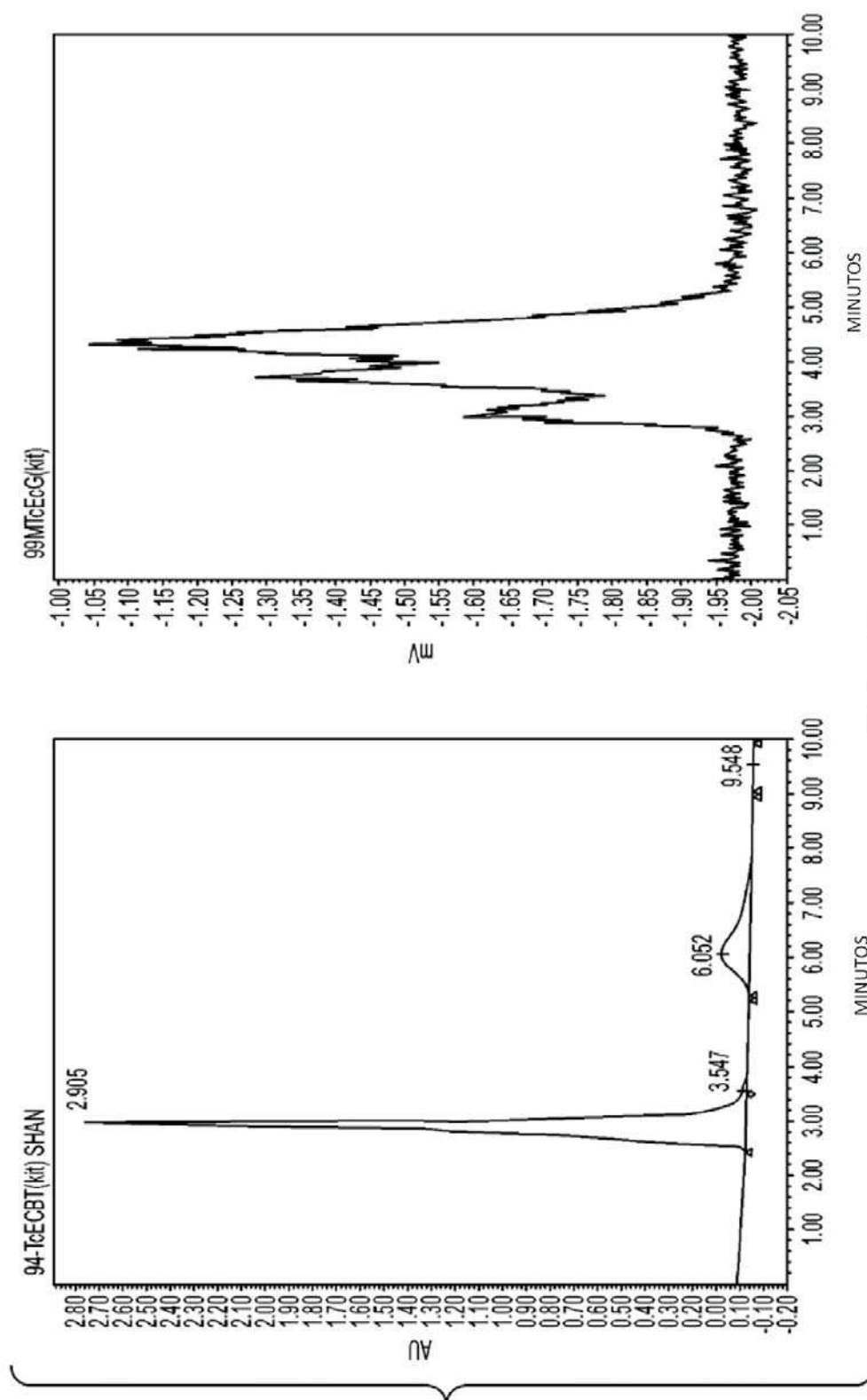


FIG. 17

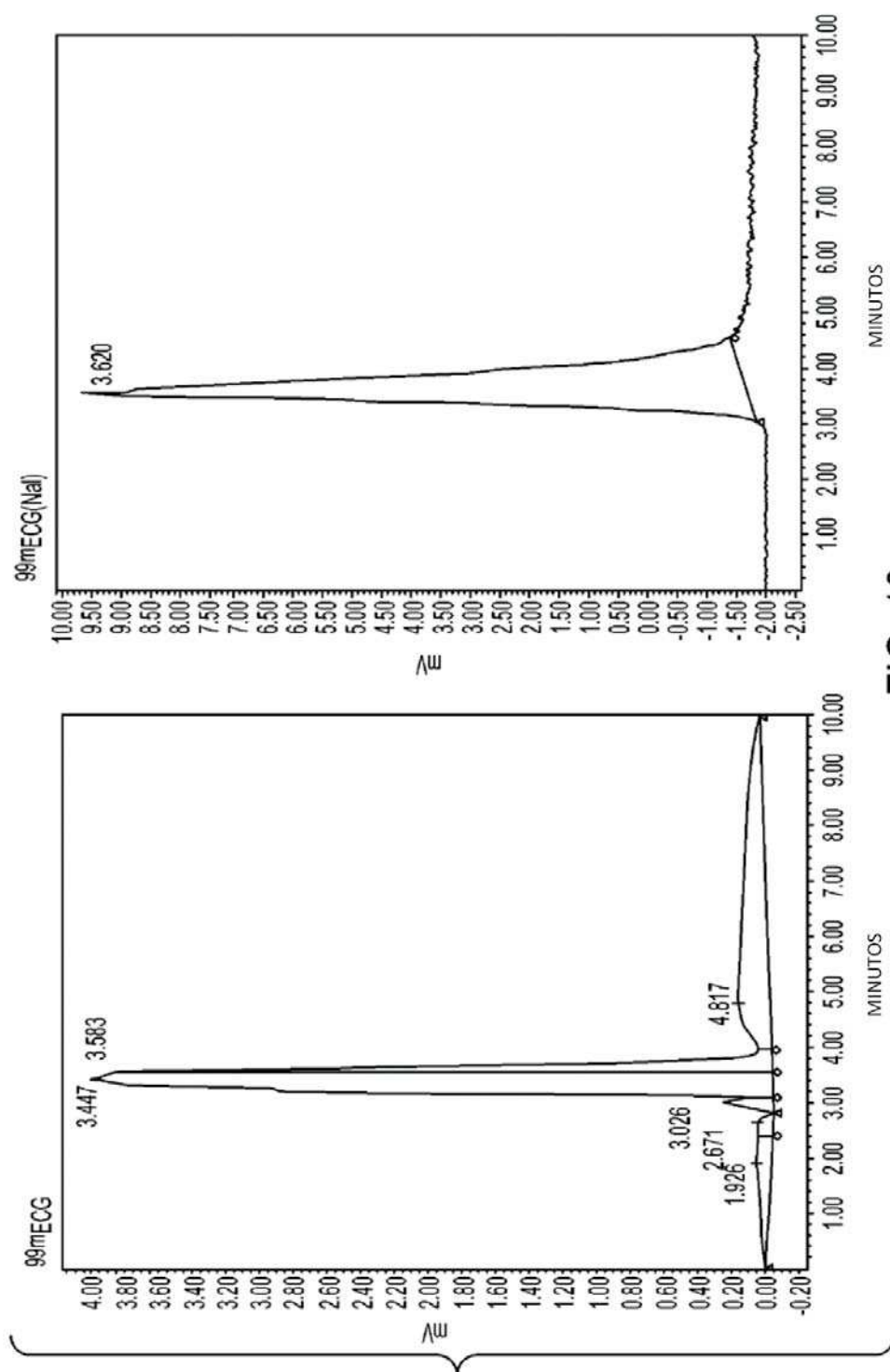


FIG. 18



$^{99m}\text{Tc}$ -ECG E COMPARAÇÃO DE ABSORÇÃO DE KIT EM 13762 CÉLULAS DE TUMOR MAMÁRIO DE RATO

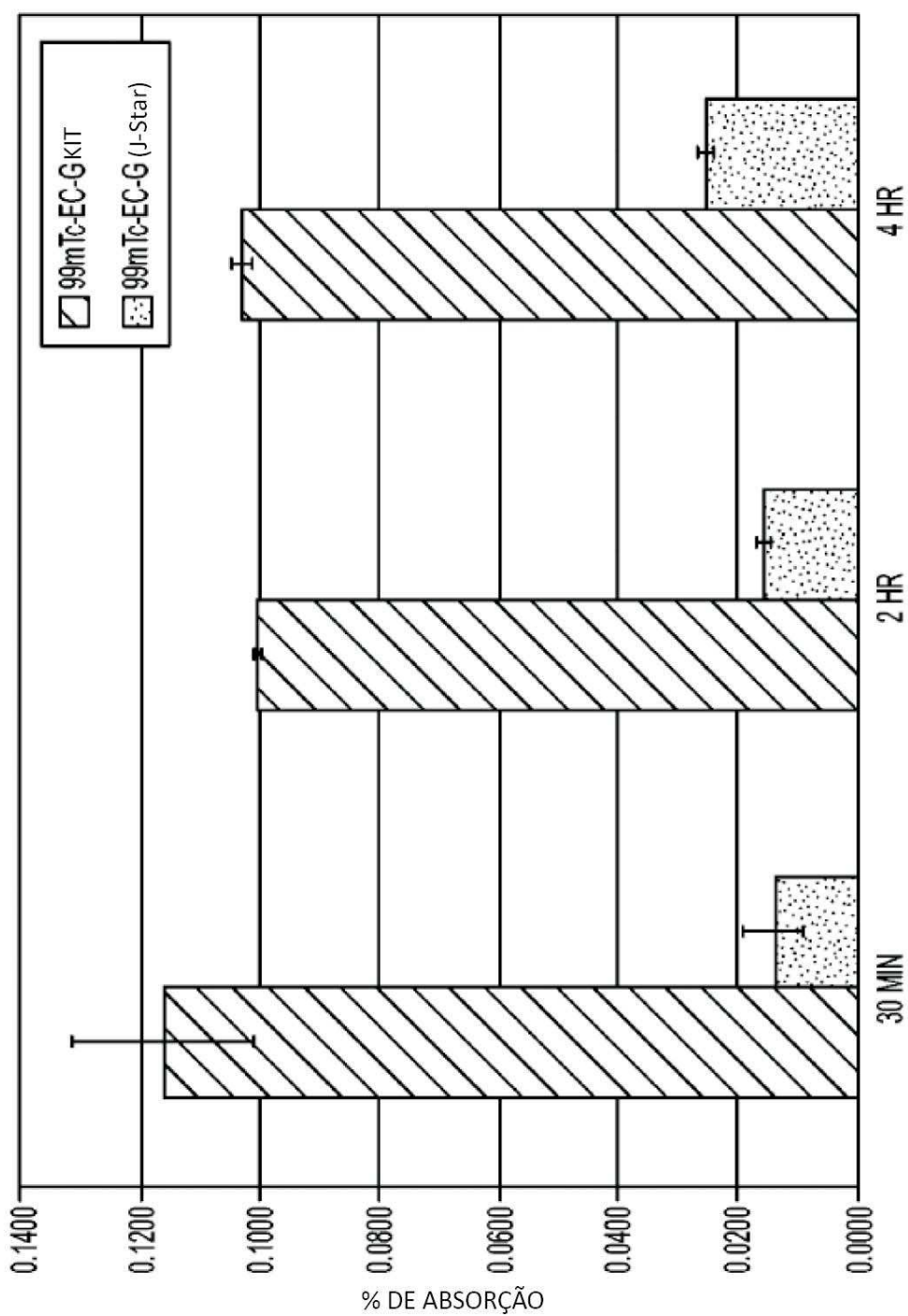


FIG. 19