



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 602 06 272 T2 2006.07.13

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 404 377 B1

(51) Int Cl.⁸: **A61K 51/00** (2006.01)

(21) Deutsches Aktenzeichen: **602 06 272.1**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/GB02/03168**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **02 745 600.3**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2003/006070**

(86) PCT-Anmeldetag: **10.07.2002**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **23.01.2003**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **07.04.2004**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **21.09.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **13.07.2006**

(30) Unionspriorität:

0116815 10.07.2001 GB

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR

(73) Patentinhaber:

**GE Healthcare Ltd., Little Chalfont,
Buckinghamshire, GB**

(72) Erfinder:

**ARCHER, Mill., Colin, Amersham,
Buckinghamshire HP7 9LL, GB; WADSWORTH,
John., Harry, Amersham, Buckinghamshire HP7
9LL, GB; ENGELL, Torgrim, 0401 Oslo, NO**

(74) Vertreter:

**Hammonds Rechtsanwälte Patentanwälte, 80539
München**

(54) Bezeichnung: **CHELATORKONJUGATE MIT VERBESSERTEN EIGENSCHAFTEN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingeleitet, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

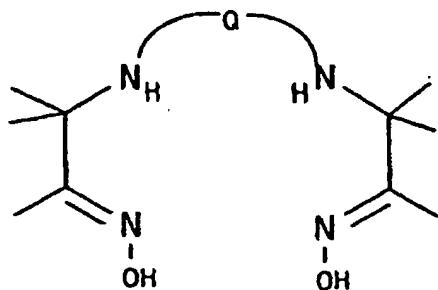
Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung**Gebiet der Erfindung**

[0001] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf verbesserte Chelatorkonjugate mit biologischen Targeting-molekülen, die zum Bilden von Metallkomplexen mit Radiometallen geeignet sind. Die Radiometallkomplexe sind als Radiopharmazeutika, insbesondere mit ^{99m}Tc , nützlich.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Diamindioxime sind eine bekannte Klasse von Chelatiermitteln, für die gezeigt wurde, dass sie bilden



$Q=-(\text{CH}_2)_3$ - d.h. Propylenaminoxim oder PnAO;

$Q=-(\text{CH}_2)_4$ - d.h. Butylenaminoxim oder BnAO;

$Q=-(\text{CH}_2)_5$ - d.h. Pentylenaminoxim oder PentAO;

– Komplexe mit dem Radiometall ^{99m}Tc .

[0003] Der Ligand PentAO wurde zuerst von S. Jurisson et al. [Inorg. Chem., 26, 3576-82(1987)] offenbart, die zeigten, dass sein Metallkomplex mit dem langlebigen Radiometall ^{99}Tc neutral war, mit einem Tc(V)-Dioxo-Kern (d.h. TcO_2^+). J-M Lo et al.

[0004] [Appl. Rad. Inst, 44, 1139-46 (1993)] beschrieb die Synthese von PentAO und seine Komplexierung mit ^{99m}Tc .

[0005] US 5688487 offenbart Chelatkonjugate von Diamindioximen mit einer C_{2-5} -Alkylenbrücke mit biologischen Targeting-Nitroimidazol-Molekülen, zur Bildgebung von Hypoxie. Die Konjugation des Nitroimidazols an die C1(Oximmethyl)-Position wird beschrieben.

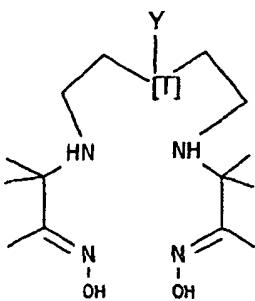
[0006] WO 95/04552 offenbart Nitroimidazol-Konjugate von BnAO und PentAO. Das Beispiel zeigt eine Konjugation an die C1(Oximmethyl)-Position.

[0007] WO 95/19187 offenbart Konjugate linearer oder cyclischer synthetischer 3-50-mer-Peptide mit Polydentat-Chelatiermitteln, die an den Peptid-Carboxyl-Terminus gebunden sind, zur Verwendung als Radiopharmazeutika. Diamindioxime, wie PnAO, BnAO und PentAO werden als geeignete Chelatiermittel beschrieben.

[0008] WO 99/60018 offenbart Diamindioxim-Chelatkonjugate von Diamindioxim-Liganden mit Peptiden für die Bildgebung eines Thrombus. Es wird angegeben, dass ein bevorzugter derartiger Chelator ein Diamindioxim mit $Q=-(\text{CH}_2)_2\text{NR}(\text{CH}_2)_2$ - ist

Die vorliegende Erfindung

[0009] Die Diamindioxim-Peptid-Chelatorkonjugate von WO 99/60018 der Formel I



Formel I

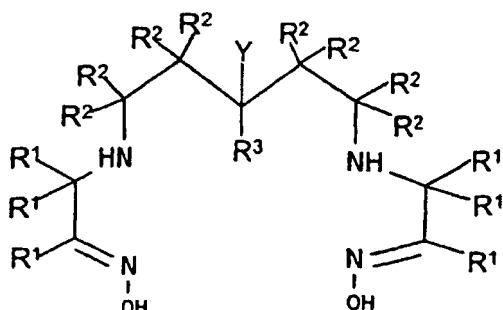
wobei T = N und Y= -CH₂CH₂NH-[Peptid],

unterliegen jedoch signifikanten Nachteilen. So bildet bei Chelatierung mit ^{99m}Tc dieses Aza-diamindioxim mehrere Technetium-Spezien, die durch Chromatographie getrennt und detektiert werden können. Bei Umgebungstemperatur werden die anfänglichen radiomarkierten Spezien (Zwischenprodukte) mit der Zeit (2 bis 3 Stunden) zu einem stabilen Produkt umgewandelt. Diese Zwischenprodukt-Produkt-Umwandlung kann durch die Verwendung eines höheren pH (> pH 8) und Erwärmen gefördert werden. Diese Bedingungen sind in einer Klinik-Radiopharmazie nicht ideal, deshalb ist ein Chelator mit weniger Zwischenprodukten und/oder einer schnelleren Zwischenprodukt-Produkt-Umwandlungsgeschwindigkeit erwünscht. Klar unerwünscht ist die Notwendigkeit zum Erwärmen und möglicherweise einem relativ hohen pH, um adequate radiochemische Reinheit (RCP) der erwünschten ^{99m}Tc-Spezien zu erreichen, da ein derartiges Erwärmen das gebundene biologische Targetingmolekül oder -peptid abbauen könnte. Ein weiteres Problem mit den Azadiamindioxim-Chelatoren der Formel I ist, dass der Stickstoff des tertiären Amins der Brückenkopfposition relativ basisch ist. Dies bedeutet, dass bei der Bildung des entsprechenden ^{99m}Tc-Komplexes in wässriger Lösung das tertiäre Amin mindestens teilweise protoniert wird, mit dem Ergebnis, dass das Konjugat geladen ist. Diese Ladung kann die Anwendungen der markierten biologischen Targetingeinheit beschränken, da die Ladung es schwieriger für das radiomarkierte Konjugat machen kann, Zellmembranen zu durchqueren.

[0010] Die vorliegende Erfindung stellt ein alternatives Chelatorsystem (Formel I, bei der T = C) bereit, das diese Probleme des Stands der Technik überwindet und stellt Konjugate bereit, die radiomarkiert werden können, um eine gute RCP bei Raumtemperatur zu ergeben, unter wässrigen Bedingungen, bei einem nahezu neutralen pH. Die Radiometall-Komplexe sind von guter Stabilität. N2S2- und N3S-Thiol-enthaltende bifunktionelle Chelatoren des Stands der Technik unterliegen dem Nachteil, dass die Thiole lufotempfindlich sind, wobei sie in Luft zu den entsprechenden Disulfiden unter neutralen bis basischen Bedingungen oxidieren. Sie müssen deshalb vor der Verwendung in einer inerten Atmosphäre oder in einer Schutzmatrix gehalten werden. Alternativ können sie als geschützte Spezien, wie Thioacetat oder ein Tetrahydropyran-1-Hemithioketal verwendet werden, aber dies macht die Entfernung von Schutzgruppen vor der Verwendung mit Säure oder Base und Erwärmen nötig. All diese Merkmale verringern die Einfachheit dieser Chelatoren im Vergleich zu den Chelatoren der vorliegenden Erfindung. Daher sind die vorliegenden Chelatoren für die Konjugation und das Radio-markieren eines weiten Bereichs von biologischen Targetingeinheiten nützlich.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0011] In einem ersten Aspekt stellt die vorliegende Erfindung ein Chelatorkonjugat eines Diamindioxim-Liganden mit einer biologischen Targetingeinheit bereit. Der Begriff „Chelatorkonjugat“ bedeutet eine Verbindung, bei der ein Metall-Chelatiermittel kovalent an eine biologische Targetingeinheit gebunden („konjugiert“) ist. Das Chelatorkonjugat ist von der Formel II:



Formel II

wobei:

jedes R¹, R² und R³ unabhängig für eine R-Gruppe steht;

Y für -(A)_n-X-Z steht;

wobei: X für -NR⁴-, -CO₂-, -N(C=S)-, -N(C=O)-, -S- oder -O- steht;

Z für eine biologische Targetingeinheit steht;

R⁴ unabhängig für eine R-Gruppe steht;

-(A)_n- für eine Linkergruppe steht, bei der jedes A unabhängig -CR₂-, -CR=CR-, -C≡C-, -NRCO-, -CONR-, -SO₂NR-, -NRSO₂-, -CR₂OCR₂-, -CR₂SCR₂-, -CR₂NRCR₂-, eine C₄₋₈-Cycloheteroalkylengruppe, eine C₄₋₈-Cycloalkylen-Gruppe, eine C₅₋₁₂-Arylengruppe, eine C₃₋₁₂-Heteroarylengruppe oder eine Polyalkylen glycol-, Polymilchsäure- oder Polyglycolsäureeinheit ist;

n eine ganze Zahl des Wertes 0 bis 10 ist;

jede R-Gruppe unabhängig für N oder C₁₋₁₀-Alkyl, C₃₋₁₀-Alkylaryl, C₂₋₁₀-Alkoxyalkyl, C₁₋₁₀-Hydroxyalkyl, C₁₋₁₀-Fluoralkyl steht, oder zwei oder mehr R-Gruppen, die zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen carbozyklischen, heterozyklischen, gesättigten oder ungesättigten Ring bilden.

[0012] Mit dem Begriff „biologische Targetingeinheit“ ist gemeint: 3-100-mer-Peptide oder Peptidanaloga, die lineare Peptide oder cyclische Peptide oder Kombinationen davon sein können; monoklonale Antikörper oder Fragmente davon; oder Enzymsubstrate oder Inhibitoren; synthetische Rezeptor-bindende Verbindungen; Oligonucleotide oder Oligo-DNA- oder Oligo-RNA-Fragmente. Die biologische Targetingeinheit kann synthetischen oder natürlichen Ursprungs sein, ist aber bevorzugt synthetisch. Bevorzugte biologische Targetingeinheiten sind 3-20-mer-Peptide, die von synthetischem oder natürlichen Ursprung sein können, sind aber bevorzugt synthetisch. Mit dem Begriff „cyclisches Peptid“ ist eine Sequenz von 5 bis 15 Aminosäuren gemeint, in denen die zwei terminalen Aminosäuren miteinander durch eine kovalente Bindung verbunden sind, die ein Peptid oder eine Disulfidbindung oder eine synthetische Nicht-Peptidbindung, wie eine Thioether-, Phosphodiester-, Disiloxan- oder Urethanbindung.

[0013] Mit dem Begriff „Aminosäure“ ist gemeint eine L- oder D-Aminosäure, ein Aminosäureanalogon oder Aminosäuremimetikum, die natürlich auftretend oder von rein synthetischem Ursprung sein können, und optisch rein sein können, d.h. ein einzelnes Enantiomer und daher chiral, oder eine Mischung von Enantiomeren. Bevorzugt sind die Aminosäuren der vorliegenden Erfindung optisch rein. Mit dem Begriff „Aminosäuremimetikum“ sind gemeint synthetische Analoga natürlich auftretender Aminosäuren, die Isoletere sind, d.h. entworfen wurden, um die sterische und elektronische Struktur der natürlichen Verbindung zu imitieren. Derartige Isoletere sind jenen Fachleuten gut bekannt und umfassen, sind aber nicht beschränkt auf Depsipeptide, Retro-Inverso-Peptide, Thioamide, Cycloalkane oder 1,5-disubstituierte Tetrazole [s. M. Goodman, Biopolymers, 24, 137, (1985)].

[0014] Geeignete Peptide zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung umfassen:

- Somatostatin, Octreotid und Analoga,
- Peptide, die einen ST-Rezeptor binden, wobei sich ST auf das Wärme-stabile Toxin bezieht, das von E. coli und anderen Mikroorganismen erzeugt wird,
- Lamininfragmente, z.B. YIGSR, PDSGR, IKVAV, LRE und KCQAGTFALRGDPQG,
- N-Formylpeptide zum Targeting von Stellen der Leukozytenakkumulation,
- Plättchenfaktor 4 (PF4) und Fragmente davon,
- RGD-enthaltende Peptide,
- Peptidfragmente von α_2 -Antiplasmin, Fibronektin oder beta-Kasein, Fibrinogen oder Thrombospondin. Die Aminosäuresequenzen von α_2 -Antiplasmin, Fibronektin, beta-Kasein, Fibrinogen oder Thrombospondin können in den folgenden Literaturhinweisen gefunden werden: α_2 -Antiplasmin-Precursor [M. Tone et al., J. Biochem, 102, 1033 (1987)]; beta-Kasein [L. Hansson et al., Gene 139, 193 (1994)]; Fibronektin [A. Gutman et al., FEBS Lett. 207, 145, (1996)]; Thrombospondin-1-Precursor [V. Dixit et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 83, 5449, (1986)]; R. F. Doolittle, Ann. Rev. Biochem., 53, 195, (1994)].

[0015] Bevorzugt umfassen die Peptide der vorliegenden Erfindung eine Aminosäuresequenz, die stammt vom N-Terminus von:

- (i) α_2 -Antiplasmin,

d.h. NH₂-Asn-Gln-Glu-Gln-Val-Ser-Pro-Leu-Thr-Leu-Thr-Leu-Lys-OH oder Varianten von diesem, in denen eine oder mehrere Aminosäuren ausgetauscht, hinzugefügt oder entfernt sind, wie:

NH₂-Asn-Gln-Glu-Gln-Val-Ser-Pro-Leu-Thr-Leu-Thr-Leu-Lys-Gly-OH

NH₂-Asn-Gln-Glu-Ala-Val-Ser-Pro-Leu-Thr-Leu-Thr-Leu-Lys-Gly-OH

NH₂-Asn-Gln-Glu-Gln-Val-Gly-OH; oder

- (ii) Kasein

d.h. Ac-Leu-Gly-Pro-Gly-Gln-Ser-Lys-Val-Ile-Gly.

[0016] Synthetische Peptide der vorliegenden Erfindung können durch herkömmliche Festphasensynthese erhalten werden, wie beschrieben in P. Lloyd-Williams, F-Albericio und E. Girald; Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins, CRC-Press, 1997.

[0017] Geeignete monoklonale Antikörper oder Fragmente davon zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung umfassen: Antikörper zum CD-20-Antigen, das auf der Oberfläche von B-Zellen exprimiert ist; Anti-Leukozyten- oder Anti-Granulozyten-Antikörper, Anti-Myosin-Antikörper oder Antikörper gegen carcinoembryonisches Antigen (CEA).

[0018] Geeignete Enzymsubstrate oder Inhibitoren umfassen Glucose und Glucose-Analoga, wie Fluorodesoxyglucose, Fettsäuren oder Elastase-Inhibitoren.

[0019] Geeignete synthetische Rezeptor-bindende Verbindungen umfassen Estradiol, Östrogen, Progestin, Progesteron und andere Steroidhormone; Liganden für den Dopamin-D-1- oder D-2-Rezeptor oder Dopamin-Transporter, wie Tropane; und Liganden für den Serotoninrezeptor.

[0020] Mit dem Begriff „Fluoralkyl“ ist eine Alkylgruppe mit mindestens einem Fluorsubstituenten gemeint, d.h. der Begriff umfasst Gruppen von Monofluoralkyl (z.B. $-\text{CH}_2\text{F}$) bis Perfluoralkyl (d.h. CF_3).

[0021] In den Diamindioxim-Chelatoren der vorliegenden Erfindung steht R^3 bevorzugt für N. Es ist auch bevorzugt, dass mindestens eine R^2 -Gruppe für H steht, bevorzugter stehen all die R^2 -Gruppen für H. Jedes R^1 steht bevorzugt für C_{1-3} -Alkyl, C_{2-4} -Alkoxyalkyl, C_{1-3} -Hydroxyalkyl oder C_{1-3} -Fluoralkyl und ist am meisten bevorzugt C_{1-3} -Alkyl oder C_{1-3} -Fluoralkyl. Es ist am meisten speziell bevorzugt, dass all die R^1 -Gruppen für CH_3 stehen.

[0022] Bevorzugte Chelatorkonjugate der Formel II, in der zwei oder mehr R-Gruppen, die zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen carbocyclischen, heterocyclischen, gesättigten oder ungesättigten Ring bilden, umfassen derartige Ringe mit 3-6 Gliedern, insbesondere 5-6 Gliedern. Am meisten bevorzugte derartige Ringe sind gesättigte carbocyclische Ringe. Bevorzugte carbocyclische Ringe sind jene, in denen 2 R^1 -Gruppen, die entweder an dieselben oder benachbarte Kohlenstoffatome gebunden sind, kombiniert sind, um 3-6-gliedrige, insbesondere 5- oder 6-gliedrige gesättigte Ringe zu bilden.

[0023] Es wird in Betracht gezogen, dass die Rolle der Linkergruppe $-(\text{A})_n$ dazu dient, den relativ voluminösen Radiometallkomplex, der bei der Metallkoordination resultiert, von der aktiven Stelle der biologischen Targetingseinheit derart zu beabstandten, dass z.B. die Rezeptorbindung nicht beeinträchtigt wird. Dies kann erreicht werden durch eine Kombination der Flexibilität (z.B. einfache Alkylketten) derart, dass die voluminöse Gruppe die Freiheit hat, sich selbst weg von der aktiven Stelle zu positionieren, und/oder eine Starrheit hat, wie ein Cycloalkyl- oder Aryl-Spacer, der den Metallkomplex weg von der aktiven Stelle orientiert. Die Natur der Linkergruppe kann auch verwendet werden, um die Biodistribution des resultierenden Radiometallkomplexes des Konjugats zu modifizieren. So wird z.B. die Einführung von Ethergruppen in den Linker helfen, die Plasmaproteinbindung zu minimieren. Bevorzugte Linkergruppen $-(\text{A})_n$ besitzen eine Rückgratkette von verknüpften Atomen, die ausmachen, dass die $-(\text{A})_n$ -Einheit 2 bis 10 Atome, am meisten bevorzugt 2 bis 5 Atome enthält, wobei 2 oder 3 Atome sehr speziell bevorzugt sind. Eine minimale Linkergruppen-Rückgratkette von 2 Atomen verleiht den Vorteil, dass der Chelator von der biologischen Targetingseinheit derart gut getrennt ist, dass jegliche Wechselwirkung minimiert wird. Ein weiterer Vorteil ist, dass die mögliche Chelatring-Größe der X- und Z-Gruppen so groß (mindestens 8 für eine 2-Atom-Rückgratkette) ist, dass es unwahrscheinlich ist, dass diese Gruppen effektiv mit der Koordination des Chelators an ein Radiometall konkurrieren. Auf diese Weise werden sowohl die biologischen Targeting-Eigenschaften der biologischen Targetingseinheit, als auch die Metallkomplexbildende-Fähigkeit des Diamindioxim-Chelators in Konjugaten dieses Typs aufrechterhalten.

[0024] Nicht-Peptid-Linkergruppen, wie Alkylengruppen oder Arylengruppen besitzen den Vorteil, dass es keine signifikanten Wasserstoffbindungs-Wechselwirkungen mit der konjugierten biologischen Targetingseinheit derart gibt, dass der Linker sich nicht auf der biologischen Targetingseinheit umwickelt. Bevorzugte Alkylengruppen sind $-(\text{CH}_2)_n-$, wobei n für 2 bis 5 steht. Bevorzugte Arylen-Spacer sind von der Formel:



wobei a und b unabhängig für 0, 1 oder 2 stehen.

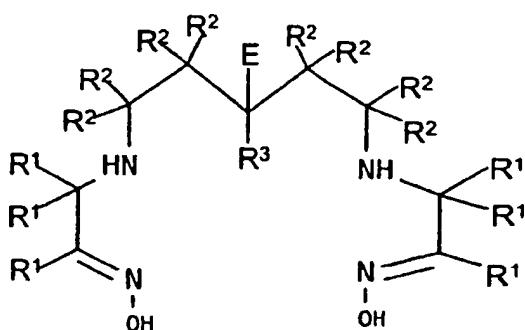
[0025] Eine bevorzugte Y-Gruppe ist daher $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-X-Z}$, am meisten bevorzugt $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-NR}^4\text{-Z}$, wobei Y = $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-NH-Z}$ speziell bevorzugt ist. Diese Gruppierung besitzt den zusätzlichen Vorteil, dass sie vom Zwischenprodukt $\text{R}^3\text{C}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-NH}_2)_3$, bevorzugt dem Zwischenprodukt $\text{HC}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-NH}_2)_3$, stammt, die, da sie symmetrisch sind, viel leichter zu synthetisieren sind, da Triamine mit unterschiedlichen Kettenlängen die Verwendung von synthetischen Strategien erfordern würden, um die verschiedenen Amine (z.B. über Schutzgruppen) zu unterscheiden.

[0026] Die Gruppe X ist eine funktionelle Gruppe, die eine einfache Konjugation des Chelatiermittels an die biologische Targetingeinheit Z erlaubt. Da die meisten Peptide und Proteine verfügbare Carboxyl- oder Aminostellen für die Funktionalisierung besitzen, sind bevorzugte X-Gruppen, wenn Z ein Peptid oder Protein ist, $-\text{NR}^4\text{-}$ und $-\text{CO}_2\text{-}$, da diese eine einfache Konjugation über Amidbindungen erlauben. Cystein-enthaltende Peptide und Proteine können freie Thiolgruppen besitzen, bevorzugte X-Gruppen, wenn Z ein Cystein-enthaltendes Peptid oder Protein ist, sind Thiol-phile Gruppen, wie Maleimid oder Acrylamid, da diese eine einfache Konjugation über Thioetherbindungen erlauben.

[0027] Bevorzugte Diamindioxim-Chelatoren der vorliegenden Erfindung sind symmetrisch, d.h. die zwei $-\text{CH}_2\text{R}^2\text{NHCR}^1\text{C}(\text{=N-OH})\text{R}^1$ -Substituenten auf der $-\text{CY}(\text{R}^3)$ -Einheit sind so gewählt, dass sie dieselben sind. Dies besitzt den Vorteil, dass der Chelator kein chirales Zentrum enthält, da derartige Zentren diastereomere Radiometallkomplexe erzeugen können und möglicherweise die Reinigung von besonderen Isomeren erfordern.

[0028] Die Chelatorkonjugate der Formel II können optional in Säuresalzform verwendet werden, d.h. wo ein oder mehrere Amine entweder des Diamindioxim-Donorsatzes oder die Y-Gruppe mit einer biokompatiblen Säure protoniert sind. Derartige Salze können direkt erhalten werden, z.B. durch HPLC-Reinigung, die derartige Säuren in der mobilen Phase (z.B. Essig- oder Trifluoressigsäure) einsetzen, oder durch Zugabe der biokompatiblen Säure zu einer Lösung des Chelatorkonjugats. Die Salzform kann nützlich sein, um die Reinigung (z.B. über Präzipitation oder Umkristallisieren) zu unterstützen, oder können die Auflösung in wässrigem Medium (wonach der pH auf einfache Weise, falls nötig, eingestellt werden kann) vereinfachen.

[0029] Die Chelatorkonjugate der vorliegenden Erfindung können durch Reaktion eines bifunktionellen Chelators der Formel III mit der biologischen Targetingeinheit erzeugt werden:



Formel III

wobei:

jedes R^1 , R^2 und R^3 unabhängig für eine R-Gruppe steht;

E für $-(\text{A})_n\text{-J}$ steht;

wobei: J für eine funktionelle Gruppe steht, die zur Konjugation an Z geeignet ist;

$-(\text{A})_n$ - für eine Linkergruppe steht, wobei jedes A unabhängig steht für $-\text{CR}_2\text{-}$, $-\text{CR=CR-}$, $-\text{C}\equiv\text{C-}$, $-\text{NRCO-}$, $-\text{CONR-}$, $-\text{SO}_2\text{NR-}$, $-\text{NRSO}_2\text{-}$, $-\text{CR}_2\text{OCR}_2\text{-}$, $-\text{CR}_2\text{SCR}_2\text{-}$, $-\text{CR}_2\text{NRCR}_2\text{-}$, eine C_{4-8} -Cycloheteroalkylengruppe, eine C_{4-8} -Cycloalkylengruppe, eine C_{5-12} -Arylengruppe, eine C_{3-12} -Heteroarylengruppe oder eine Polyalkylenglycol-, Polymilchsäure- oder Polyglycolsäureeinheit;

n für eine ganze Zahl des Wertes 0 bis 10 steht;

jede R-Gruppe unabhängig steht für N oder C_{1-10} -Alkyl, C_{3-10} -Alkylaryl, C_{2-10} -Alkoxyalkyl, C_{1-10} -Hydroxyalkyl, C_{1-10} -Fluoralkyl, oder zwei oder mehr R-Gruppen, die zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen carbozyklischen, heterozyklischen, gesättigten oder ungesättigten Ring bilden.

[0030] Mit dem Begriff „funktionelle Gruppe geeignet für Konjugation“ ist eine funktionelle Gruppe gemeint, die mit einer entsprechenden funktionellen Gruppe von Z (typischerweise eine Amin-, Carboxyl- oder Thiol-Gruppe) reagiert, um den Diamindioxim-Chelator an Z chemisch zu binden. Bevorzugt derartige funktionelle Gruppen, die zur Konjugation geeignet sind, sind: $-NR^5R^6-$, $-CO_2M-$, $-NCS-$, $-NCO-$, $-SM^1-$, $-OM^1$, Maleimid oder Acrylamid, wobei R^5 und R^6 unabhängig eine R-Gruppe oder P^G sind; M für H, ein Kation, P^G oder einen aktiven Ester steht; M^1 für N oder P^G steht; und P^G für eine Schutzgruppe steht. Das Kation ist geeigneterweise ein positiv geladenes Gegenion, wie ein Metallion, ein Ammonium(NH_4^+)- oder quaternäres Ammonium- oder Phosphonium-Ion. Bevorzugt ist das Kation ein biokompatibles Kation. Die Begriffe „biokompatibles Kation“, „aktiver Ester“ und „Schutzgruppe“ sind wie unten definiert. Wenn die funktionelle Gruppe für $-NR^5R^6$ steht, steht mindestens eine und bevorzugt beide von R^5 und R^6 für H.

[0031] Mit dem Begriff „Schutzgruppe“ ist eine Gruppe gemeint, die unerwünschte chemische Reaktionen inhibiert oder unterdrückt, aber die entworfen ist, um ausreichend reaktiv zu sein, dass sie von der fraglichen funktionellen Gruppe unter Bedingungen gespalten wird, die mild genug sind, dass sie den Rest des Moleküls nicht modifizieren. Nach der Entschützung kann die fragliche Gruppe verwendet werden, um das bifunktionelle Chelat der Formel III an die biologische Targetingeinheit zu konjugieren.

[0032] Schutzgruppen sind jenen Fachleuten gut bekannt und werden geeigneterweise ausgewählt aus, wenn J für NR^5R^6 steht: Boc (wobei Boc für tert.-Butyloxycarbonyl steht), Fmoc (wobei Fmoc für Fluorenylmethoxycarbonyl steht), Trifluoracetyl, Allyloxycarbonyl, Dde [d.h. 1-(4,4-Dimethyl-2,6-dioxocyclohexyliden)ethyl] oder Npys (d.h. 3-Nitro-2-pyridylsulfenyl); und wenn J für $-CO_2P^G$ steht: Methylester, tert.-Butyl, Benzylester, wenn J für OP^G steht, sind geeignete Schutzgruppen: Acetyl, Benzoyl, Trityl (Trt) oder Tetrabutyldimethylsilyl. Wenn J für $-SP^G$ steht, sind geeignete Schutzgruppen: Trityl und 4-Methoxybenzyl. Die Verwendung weiterer Schutzgruppen wird beschrieben in „Protective Groups in Organic Synthesis“, Theodors W. Greene and Peter G.M. Wuts (John Wiley & Sons, 1991).

[0033] Mit dem Begriff „biokompatibles Kation“ ist gemeint ein positiv geladenes Gegenion, das ein Salz mit einer ionisierten, negativ geladenen Gruppe bildet, wobei das positiv geladene Gegenion auch nicht toxisch und daher geeignet für die Verabreichung an den Säugetierkörper, insbesondere an den menschlichen Körper, ist. Beispiele geeigneter biokompatibler Kationen umfassen: die Alkalimetalle (z.B. Natrium oder Kalium); die Erdalkalimetalle (z.B. Kalzium oder Magnesium); und das Ammoniumion. Ein bevorzugtes biokompatibles Kation ist das Natriumion (Na^+).

[0034] Mit dem Begriff „aktiver Ester“ ist gemeint ein Esterderivat der Kohlensäure, das entworfen ist, um eine bessere Austrittsgruppe zu besitzen, und erlaubt daher eine einfachere Reaktion mit Nukleophilen, die auf der biologischen Targetingeinheit vorhanden sind, wie Amine. Beispiele geeigneter aktiver Ester sind: N-Hydroxysuccinimid (NHS), Pentafluorophenol, Pentafluorothiophenol, para-Nitrophenol und Hydroxybenzotriazol.

[0035] Amin-funktionalisierte Chelatoren der Formel III (d.h. $J = -NR^5R^6$) können daher an die Carboxylgruppe (n) einer biologischen Targetingeinheit über Amidbindungen konjugiert werden. Dieses Koppeln kann direkt ausgeführt werden (z.B. unter Verwenden von Festphasen-Peptidsynthese) oder in Anwesenheit eines geeigneten Aktivierungsmittels, wie BOP [d.h. Benzotriazol-1-yloxy-tris(dimethylamino)phosphonium] oder N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCCI). Das Koppeln kann auch über geeignete Zwischenprodukte, wie sie in der Technik bekannt sind, ausgeführt werden, wie aktivierte Ester der Carboxylgruppe der biologischen Targetingeinheit.

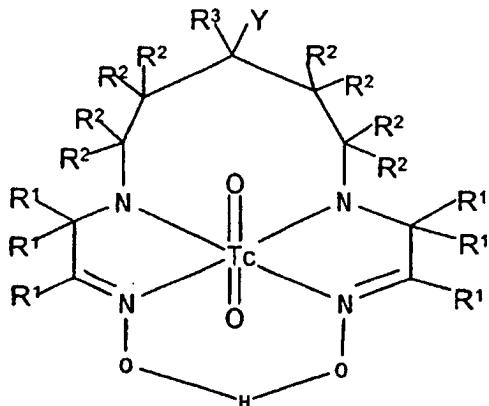
[0036] Alternativ kann die seitliche Amingruppe des bifunktionellen Chelators zuerst zu einer Isothiocyanat (-NCS)- oder Isocyanat-Gruppe (-NCO)-Gruppe umgewandelt werden, was die Konjugation an Amin enthaltende biologische Targetingeinheiten erlaubt, über die Bildung von Thioharnstoff bzw. Harnstoffverknüpfungen. Alternativ kann die seitliche Amingruppe des bifunktionellen Chelators mit einer zweibasigen Säure umgesetzt werden, um eine terminale Carboxylgruppe über die Linkergruppe einzuführen. Eine bifunktioneller Chelator, der eine Carboxylgruppe (d.h. $J = -CO_2M$) trägt, kann auf eine ähnliche Weise verwendet werden, um direkt an Aminenthaltende biologische Targetingeinheiten über eine Amidbindung zu koppeln. Das bifunktionelle Chelat kann auch eine Gruppe tragen, die entworfen ist, um mit Thiolgruppen auf der biologischen Targetingeinheit zu reagieren, um stabile Thioetherbindungen zu bilden. Beispiele derartiger Gruppen sind Maleimide (die

durch Reaktion von Maleinsäureanhydrid mit dem entsprechenden Amin, gefolgt von Erwärmen von Essigsäureanhydrid hergestellt werden können) und Acrylamide (die durch Reaktion von Acrylylchlorid mit dem Amin hergestellt werden können.)

[0037] In einem zweiten Aspekt stellt die vorliegende Erfindung Radiometallkomplexe des oben beschriebenen Chelatorkonjugats bereit. Geeignete Radiometalle können entweder Positronenemitter, wie ^{64}Cu , ^{48}V , ^{52}Fe , ^{55}Co , ^{94m}Tc oder ^{68}Ga , oder γ -Emitter, wie ^{99m}Tc , ^{111}In , ^{113m}In , oder ^{67}Ga , sein. Die meisten bevorzugten Radiometalle für diagnostische Bildgebung sind γ -Emitter, insbesondere ^{99m}Tc . Metallkomplexe bestimmter Radionuklide können als Radiopharmazeutika für die Radiotherapie verschiedener Krankheiten, wie Krebs oder die Behandlung von Thrombose oder Restenose nützlich sein. Nützliche Radioisotope für derartige radiotherapeutische Anwendungen umfassen ^{90}Y , ^{89}Sr , ^{67}Cu , ^{103}Pd , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{169}Er , ^{153}Sm und ^{189}Au . Es ist stark bevorzugt, dass die biologische Targetingeinheit Z an den Chelator auf eine derartige Weise gebunden ist, dass die Bindung keinen einfachen Metabolismus im Blut durchläuft, was dazu führen würde, dass der Metallkomplex abgespalten wird, bevor die markierte biologische Targetingeinheit die erwünschte in-vivo-Zielstelle erreicht. Die biologische Targetingeinheit ist deshalb bevorzugt an die Metallkomplexe der vorliegenden Erfindung über Bindungen kovalent gebunden, die nicht einfach metabolisiert werden (wie z.B. Esterbindungen).

[0038] Bevorzugte Radiometallkomplexe der vorliegenden Erfindung sind symmetrisch, d.h. die zwei $-\text{CR}_2^2\text{R}_2^2\text{NHCR}_1^1\text{C}(\text{=N-OH})\text{R}_1^1$ -Substituenten auf der $-\text{CY}(\text{R}_3^3)$ -Einheit sind gewählt, dass sie dieselben sind. Dies besitzt den Vorteil, dass der Radiokomplex kein chirales Zentrum enthält, da derartige Zentren diastereomere Radiometallkomplexe erzeugen können, und möglicherweise die Reinigung von besonderen Isomeren erfordern. Es ist auch bevorzugt, dass der Radiometallkomplex des Chelatorkonjugats elektrisch neutral ist.

[0039] Es wird geglaubt, dass die ^{99m}Tc -Komplexe der Chelatoren der vorliegenden Erfindung



neutrale Tc(V)-Dioxo-Komplexe sind, wie oben gezeigt.

[0040] In den ^{99m}Tc -Diamindioxim-Komplexen der vorliegenden Erfindung steht R3 bevorzugt für H. Es ist auch bevorzugt, dass mindestens eine R²-Gruppe für H steht, bevorzugter stehen all die R²-Gruppen für H. Jedes R¹ steht bevorzugt für C₁₋₃-Alkyl, C₂₋₄-Alkoxyalkyl, C₁₋₃-Hydroxyalkyl, oder C₁₋₃-Fluoralkyl und steht bevorzugt für C₁₋₃-Alkyl oder C₁₋₃-Fluoralkyl. Es ist am meisten speziell bevorzugt, dass all die R¹-Gruppen für CH₃ stehen. Bevorzugte Y-Gruppen für den ^{99m}Tc -Komplex sind wie oben beschrieben für das Chelatorkonjugat.

[0041] Bevorzugte Radiometallkomplexe der vorliegenden Erfindung, bei denen zwei oder mehr R-Gruppen, die zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen carbocyclischen, heterocyclischen, gesättigten oder ungesättigten Ring bilden, umfassen derartige Ringe mit 3-6 Gliedern, insbesondere 5-6 Gliedern. Am meisten bevorzugte derartige Ringe sind gesättigte carbocyclische Ringe. Bevorzugte carbocyclische Ringe sind jene, in denen zwei R¹-Gruppen, die entweder an dieselben oder an benachbarte Kohlenstoffatome gebunden sind, kombiniert sind, um 3-6-gliedrige, insbesondere 5- oder 6-gliedrige, gesättigte Ringe zu bilden.

[0042] Die Radiometallkomplexe der vorliegenden Erfindung können durch Umsetzen einer Lösung des Radiometalls in dem geeigneten Oxidationszustand mit dem Chelatkonjugat bei dem geeigneten pH hergestellt werden. Die Lösung kann bevorzugt einen Liganden enthalten, der an das Metall schwach komplexiert (wie Gluconat oder Citrat), d.h. der Radiometallkomplex wird durch Ligandenaustausch oder Trans-Chelatierung hergestellt. Derartige Bedingungen sind nützlich, um unerwünschte Nebenreaktionen, wie die Hydrolyse des Metallions, zu unterdrücken. Wenn das Radiometallion für ^{99m}Tc steht, ist das übliche Ausgangsmaterial Natriumpertechnetat von einem ^{99}Mo -Generator. Technetium ist im ^{99m}Tc -Pertechnetat im Tc(VII)-Oxidationszustand

vorhanden, der relativ unreaktiv ist. Die Herstellung von Technetium-Komplexen niedrigerer Oxidationszustände von Tc(I) bis Tc(V) erfordert deshalb üblicherweise die Zugabe eines geeigneten pharmazeutisch annehmbaren Reduktionsmittels, wie Natriumdithionit, Natriumbisulfit, Ascorbinsäure, Formamidinsulfinsäure, Zinnion, Fe(II) oder Cu(I), um die Komplexierung zu vereinfachen. Das pharmazeutisch annehmbare Reduktionsmittel ist bevorzugt ein Zinnsalz, am meisten bevorzugt Zinnchlorid, Zinnfluorid oder Zinntartrat.

[0043] In einem dritten Aspekt stellt die vorliegende Erfindung Radiopharmazeutika bereit, die die oben genannten Radiometallkomplexe der Chelatorkonjugate in einer sterilen Form, die für die Verabreichung an Menschen geeignet ist, umfassen. Derartige Radiopharmazeutika werden üblicherweise geliefert in entweder einem Behälter, der mit einem Siegel versehen ist, das für Einzel- oder Vielfachdurchlöcherung mit einer hypodermischen Nadel geeignet ist (z.B. einem aufgequetschten Septum-Siegel-Verschluss), während sterile Integrität beibehalten wird. Derartige Behälter können Einzel- oder Vielfachpatientendosen enthalten. Bevorzugte Mehrfachdosis-Behälter umfassen ein einzelnes Großmengenglasfläschchen (z.B. von 10 bis 30 cm³ Volumen), das Vielfachpatientendosen enthält, wodurch Einzelpatientendosen so in klinisch reine Spritzen bei verschiedenen Zeitintervallen während der praktikablen Lebensdauer des Präparats abgezogen werden können, um sich für die klinische Situation zu eignen. Vorgefüllte Spritzen sind entworfen, um eine einzelne Dosis für Menschen zu enthalten, und können deshalb bevorzugt eine Wegwerf- oder andere Spritze sein, die für die klinische Verwendung geeignet ist. Die vorgefüllte Spritze kann gegebenenfalls mit einem Spritzenschirm versehen sein, um den Anwender vor der radioaktiven Dosis zu schützen. Geeignete derartige radiopharmazeutische Spritzenschirme sind in der Technik bekannt und umfassen bevorzugt entweder Blei oder Wolfram.

[0044] Ein ^{99m}Tc-Radioaktivitäts-Gehalt, der für ein diagnostisches Bildgebungs-Radiopharmazeutikum geeignet ist, liegt im Bereich von 180 bis 1500 MBq, abhängig von der in vivo abzubildenden Stelle, der Aufnahme und dem Ziel-zu-Untergrundverhältnis. Für eine Herz-Bildgebung mit einem ^{99m}Tc-Radiopharmazeutikum kann 1110 Bq (30 mCi) für eine Belastungsstudie und ca. 350 MBq (10mCi) für eine Ruhestudie verwendet werden.

[0045] In einem vierten Aspekt stellt die vorliegende Erfindung nicht-radioaktive Kits für die Herstellung der ^{99m}Tc-radiopharmazeutischen Zusammensetzung bereit. Derartige Kits sind entworfen, um sterile radiopharmazeutische Produkte zu ergeben, die für die Verabreichung an Menschen geeignet sind, z.B. über direkte Injektion in den Blutstrom. Für ^{99m}Tc ist das Kit bevorzugt lyophilisiert und entworfen, um mit steriles ^{99m}Tc-Petrechnet (TcO₄⁻) von einem ^{99m}Tc-Radioisotop-Generator zur gewünschten Konzentration verdünnt zu werden, um eine Lösung zu ergeben, die für die Verabreichung an Menschen ohne weitere Manipulation geeignet ist. Geeignete Kits umfassen einen Behälter (z.B. ein Septum-versiegeltes Glasfläschchen), der das Chelatorkonjugat der Formel II in entweder freier Base- oder Säuresalzform enthält, zusammen mit einem pharmazeutisch annehmbaren Reduziermittel, wie Natriumdithionit, Natriumbisulfit, Ascorbinsäure, Formamidinsulfinsäure, Zinnsäure, Fe (II) oder Cu (I). Das pharmazeutisch annehmbare Reduziermittel ist bevorzugt ein Zinnsalz, wie Zinnchlorid oder Zinntartrat. Alternativ kann das Kit gegebenenfalls einen Metallkomplex enthalten, der, bei Zugabe des Radiometalls, eine Transmetallierung (d.h. Metallaustausch) durchläuft, was das erwünschte Produkt ergibt.

[0046] Die nicht-radioaktiven Kits können gegebenenfalls ferner zusätzliche Bestandteile, wie einen Trans-Chelator, einen Radioprotektor, ein antimikrobiotisches Konservierungsmittel, ein pH-Einstellmittel oder einen Füllstoff umfassen. Der „Trans-Chelator“ ist eine Verbindung, die schnell reagiert, um einen schwachen Komplex mit Technetium zu bilden, und wird dann durch das Diamindioxim ersetzt. Dies minimiert das Risiko der Bildung von reduziertem hydrolysierten Technetium (RHT) aufgrund einer schnellen Reduktion des Per-technetats, das mit der Technetium-Komplexierung konkurriert. Geeignete derartige Trans-Chelatoren sind Salze einer schwachen organischen Säure, d.h. eine organische Säure mit einem pKa im Bereich von 3 bis 7, mit einem biokompatiblen Kation. Geeignete derartige schwache organische Säuren sind Essigsäure, Zitronensäure, Weinsäure, Gluconsäure, Glucoheptonsäure, Benzoesäure, Phenole oder Phosphonsäuren. Daher sind geeignete Salze Acetate, Citrate, Tartrate, Gluconate, Glucoheptonate, Benzoate, Phenolate oder Phosphonate. Bevorzugte derartige Salze sind Tartrate, Gluconate, Glucoheptonate, Benzoate oder Phosphonate, am meisten bevorzugt Phosphonate, am meisten speziell Diphosphonate. Ein bevorzugter derartiger Trans-Chelator ist ein Salz von MDP, d.h. Methylendiphosphonsäure, mit einem biokompatiblen Kation.

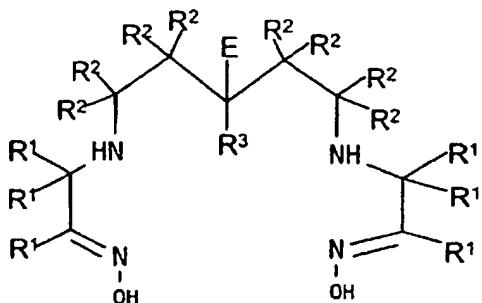
[0047] Mit dem Begriff „Radioprotektor“ ist eine Verbindung gemeint, die Abbaureaktionen, wie Redox-Prozesse, inhibiert durch Einfangen hoch-reaktiver freier Radikale, wie Sauerstoff-enthaltende freie Radikale, die aus der Radiolyse von Wasser entstehen. Die Radioprotektoren der vorliegenden Erfindung sind geeigneterweise ausgewählt aus: Ascorbinsäure, para-Aminobenzoesäure (d.h. 4-Aminobenzoesäure), Gentisinsäure (d.h. 2,5-Dihydroxybenzoesäure) und Salze davon mit einem biokompatiblen Kation wie oben beschrieben.

[0048] Mit dem Begriff „antimikrobielles Konservierungsmittel“ ist ein Mittel gemeint, das das Wachstum von möglicherweise schädlichen Mikroorganismen, wie Bakterien, Hefen oder Schimmelpilze, inhibiert. Das antimikrobielle Konservierungsmittel kann auch einige bakterizide Eigenschaften, abhängig von der Dosis, aufweisen. Die Hauptrolle des/der antimikrobiellen Konservierungsmittels) der vorliegenden Erfindung ist es, das Wachstum beliebiger derartiger Mikroorganismen in der radiofarmazeutischen Zusammensetzung nach dem Verdünnen zur gewünschten Konzentration, d.h. im radioaktiven diagnostischen Produkt selbst zu inhibieren. Das antimikrobielle Konservierungsmittel kann jedoch auch gegebenenfalls verwendet werden, um das Wachstum möglicherweise schädlicher Mikroorganismen in einer oder mehreren Komponenten des nicht-radioaktiven Kits der vorliegenden Erfindung vor dem zur gewünschten Konzentration verdünnen zu inhibieren. Geeignete antimikrobielles Konservierungsmittel umfasst/umfassen: die Parabene, d.h. Methyl-, Ethyl-, Propyl- oder Butyl-Paraben oder Mischungen davon; Benzylalkohol; Phenol; Cresol, Cetrimid und Thiomersal. Bevorzugtes antimikrobielles Konservierungsmittel sind die Parabene.

[0049] Der Begriff „pH-einstellendes Mittel“ bedeutet eine Verbindung oder eine Mischung von Verbindungen, die dazu nützlich sind, sicherzustellen, dass der pH des zur gewünschten Konzentration verdünnten Kits innerhalb annehmbarer Grenzen (annähernd pH 4,0 bis 10,5) für Menschen- oder Säugetier-Verabreichung liegt. Geeignete pH-einstellende Mittel umfassen pharmazeutisch annehmbare Puffer, wie Tricin, Phosphat oder TRIS [d.h. Tris(hydroxymethyl)aminomethan] und pharmazeutisch annehmbare Basen, wie Natriumcarbonat, Natriumbicarbonat oder Mischungen davon. Wenn das Konjugat der Formel II in Säuresalz-Form eingesetzt wird, kann das pH-einstellende Mittel gegebenenfalls in einem getrennten Glasfläschchen oder Behälter geliefert werden, so dass der Verwender des Kits den pH als Teil einer Vielschritt-Prozedur einstellen kann.

[0050] Mit dem Begriff „Füllstoff“ ist ein pharmazeutisch annehmbares Füllmittel gemeint, das die Materialhandhabung während der Produktion und Lyophilisierung vereinfachen kann. Geeignete Füllstoffe umfassen anorganische Salze, wie Natriumchlorid, und wasserlösliche Zucker, wie Saccharose, Maltose oder Trehalose.

[0051] In einem fünften Aspekt stellt die vorliegende Erfindung bifunktionelle Diamindioxim-Chelatoren der Formel III bereit, die zum Herstellen von Konjugaten des Chelators und der biologischen Targetingeinheit nützlich sind:



Formel III

wobei:

jedes R¹, R² und R³ unabhängig für eine R-Gruppe steht;

E für -(A)_n-J steht;

wobei: J für eine funktionelle Gruppe steht, die zur Konjugation an Z geeignet ist;

-(A)_n- für eine Linkergruppe steht, wobei jedes A unabhängig steht für -CR₂- , -CR=CR- , -C≡C- , -NRCO- , -CONR- , -SO₂NR- , -NRSO₂- , -CR₂OCR₂- , -CR₂SCR₂- , -CR₂NRCR₂- , eine C₄₋₈-Cycloheteroalkylengruppe, eine C₄₋₈-Cycloalkylengruppe, eine C₅₋₁₂-Arylengruppe, eine C₃₋₁₂-Heteroarylengruppe oder eine Polyalkylenglycol-, Polymilchsäure- oder Polyglycolsäureeinheit;

n für eine ganze Zahl des Wertes 0 bis 10 steht;

jede R-Gruppe unabhängig steht für H oder C₁₋₁₀-Alkyl, C₃₋₁₀-Alkylaryl, C₂₋₁₀-Alkoxyalkyl, C₁₋₁₀-Hydroxyalkyl, C₁₋₁₀-Fluoralkyl, oder zwei oder mehr R-Gruppen, die zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen carbozyklischen, heterozyklischen, gesättigten oder ungesättigten Ring bilden.

[0052] Mit dem Begriff „funktionelle Gruppe geeignet für Konjugation“ ist eine funktionelle Gruppe gemeint, die mit einer entsprechenden funktionellen Gruppe von Z (typischerweise eine Amin-, Carboxyl- oder Thiol-Gruppe) reagiert, um den Diamindioxim-Chelator an Z chemisch zu binden. Bevorzugte derartige funktionelle Gruppen, die zur Konjugation geeignet sind, sind: -NR⁵R⁶- , -CO₂M- , -NCS- , -NCO- , -SM⁻¹ , -OM¹ , Maleimid oder Acrylamid, wobei R⁵ und R⁶ unabhängig eine R-Gruppe oder P^G sind; M für H, ein Kation, P^G oder einen

aktiven Ester steht; M^1 für H oder P^G steht; und P^G für eine Schutzgruppe steht. Das Kation ist geeigneterweise ein positiv geladenes Gegenion, wie ein Metallion, ein Ammonium(NH_4^+)- oder quaternäres Ammonium- oder Phosphonium-Ion. Bevorzugt ist das Kation ein biokompatibles Kation. Die Begriffe „biokompatibles Kation“, „aktiver Ester“ und „Schutzgruppe“ sind wie oben definiert. Wenn die funktionelle Gruppe für $-NR^5R^6$ steht, steht mindestens eine und bevorzugt beide von R^5 und R^6 für H.

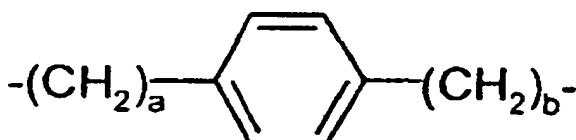
[0053] In den bifunktionellen Chelatoren der Formel III der vorliegenden Erfindung steht R^3 bevorzugt für H. Es ist auch bevorzugt, dass mindestens eine R^2 -Gruppe für H steht, bevorzugter stehen all die R^2 -Gruppen für H. Jedes R^1 steht bevorzugt für C_{1-3} -Alkyl, C_{2-4} -Alkoxyalkyl, C_{1-3} -Hydroxyalkyl oder C_{1-3} -Fluoralkyl und ist am meisten bevorzugt C_{1-3} -Alkyl oder C_{1-3} -Fluoralkyl. Es ist am meisten speziell bevorzugt, dass all die R^1 -Gruppen für CH_3 stehen.

[0054] Bevorzugte bifunktionelle Chelatoren, bei denen 2 oder mehr R-Gruppen, die zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen carbocyclischen, heterocyclischen, gesättigten oder ungesättigten Ring bilden, umfassen derartige Ringe mit 3 bis 6 Gliedern, insbesondere 5 bis 6 Gliedern. Am meisten bevorzugte derartige Ringe sind carbocyclische Ringe. Bevorzugte carbocyclische Ringe sind jene, in denen zwei R^1 -Gruppen, die entweder an dieselben oder benachbarte Kohlenstoffatome gebunden sind, kombiniert sind, um 3- bis 6-gliedrige, insbesondere 5- oder 6-gliedrige gesättigte Ringe zu bilden.

[0055] Die Chelatorkonjugate der Formel III können gegebenenfalls in Säuresalzform verwendet werden, d.h. wo ein oder mehrere Amine entweder des Diamindioxim-Donorsatzes oder die Y-Gruppe mit einer biokompatiblen Säure protoniert sind. Derartige Salze können direkt erhalten werden, z.B. durch HPLC-Reinigung, unter Einsetzen derartiger Säuren in der mobilen Phase (z.B. Essig- oder Trifluoressigsäure), oder durch Zugabe der biokompatiblen Säure zu einer Lösung des Chelatorkonjugats. Die Salzform kann nützlich sein, um die Reinigung (z.B. über Präzipitation oder Umkristallisierung) zu unterstützen, oder kann die Auflösung im wässrigen Medium vereinfachen (wonach der pH auf einfache Weise, falls nötig, eingestellt werden kann).

[0056] Bevorzugte Linker-Gruppen $-(A)_n$ des bifunktionellen Chelators besitzen eine Rückgratkette von verbundenen Atomen, die ausmachen, dass die $-(A)_n$ -Einheit 2 bis 10 Atome, am meisten bevorzugt 2 bis 5 Atome, wobei 2 oder 3 Atome speziell bevorzugt sind, enthält. Eine minimale Linkergruppen-Rückgratkette von zwei Atomen verleiht den Vorteil, dass nach der Konjugation der Chelator von der biologischen Targetingeinheit derart gut getrennt ist, dass jegliche Wechselwirkung minimiert wird. Ein weiterer Vorteil ist, dass die mögliche Chelatring-Größe der X- und Z-Gruppen so groß ist (mindestens 8 für eine 2-Atom-Rückgratkette), dass es unwahrscheinlich ist, dass diese Gruppen effektiv mit der Koordination des Chelators an ein Radiometall konkurrieren.

[0057] Nicht-peptidische Linkergruppen, wie Alkylengruppen oder Arylengruppen besitzen den Vorteil, dass es keine signifikanten Wasserstoffbindungs-Wechselwirkungen mit der konjugierten biologischen Targetingeinheit derart gibt, dass der Linker sich nicht auf der biologischen Targetingeinheit umwickelt. Bevorzugte Alkyl-Spacergruppen sind $-(CH_2)_n-$, wobei n für 2 bis 5 steht. Bevorzugte Arylen-Spacer sind von der Formel:

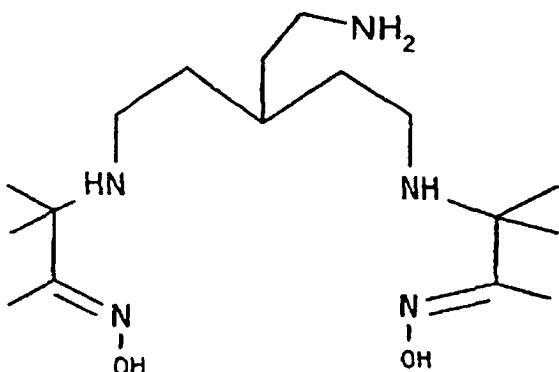


wobei a und b unabhängig für 0, 1 oder 2 stehen.

[0058] Eine bevorzugte E-Gruppe ist daher $-CH_2CH_2J$, am meisten bevorzugt $-CH_2CH_2-NR^5$ oder $-CH_2CH_2CO_2H$ oder aktiver Ester davon, wobei E = $-CH_2CH_2-NH_2$ speziell bevorzugt ist. Die Säure kann auch zu einem gemischten Anhydrid umgewandelt werden, z.B. durch Reagieren mit Isobutylchloroformiat und Base. Das gemischte Anhydrid reagiert auch mit Nukleophilen, wie Aminen. Die Gruppierung E = $-CH_2CH_2-NH_2$ besitzt den zusätzlichen Vorteil, dass sie vom Zwischenprodukt $R^3C(CH_2CH_2-NH_2)_3$, bevorzugt dem Zwischenprodukt $HC(CH_2CH_2-NH_2)_3$ stammt, das, da es symmetrisch ist, viel einfacher zu synthetisieren ist, da Triamine mit verschiedenen Kettenlängen die Verwendung synthetischer Strategien erfordern würden, um die verschiedenen Amine chemisch zu unterscheiden (z.B. über Schutzgruppen).

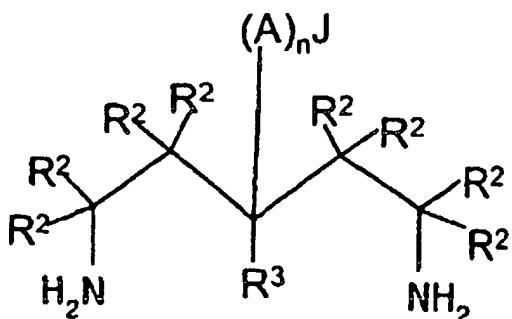
[0059] Bevorzugte bifunktionelle Diamindioxim-Chelatoren der Formel II der vorliegenden Erfindung sind symmetrisch, d.h. die zwei $-C(R^2)_2(R^2)_2NHCR^1_2(C=N-OH)R^1$ -Substituenten auf der $-CY(R^3)$ -Einheit sind so gewählt, dass sie dieselben sind. Dies besitzt den Vorteil, dass der Chelator kein chirales Zentrum enthält, da

derartige Zentren diastereomere Radiometallkomplexe erzeugen können und möglicherweise die Reinigung von besonderen Isomeren erfordern. Ein speziell bevorzugter bifunktioneller Diamindioxim-Chelator besitzt die Formel:



[0060] Säuresalze dieser Verbindung liegen auch im Umfang der vorliegenden Erfindung.

[0061] Die bifunktionellen Diamindioxim-Chelatoren der vorliegenden Erfindung können auf geeignete Weise durch Alkylierung einer Verbindung der Formel IV hergestellt werden:



Formel IV

wobei A, J R², R³ und n wie für die Formel III oben definiert sind, mit entweder:

- (i) dem geeigneten Chlornitroso-Derivat Cl-C(R¹)₂-CH(NO)R¹;
- (ii) einem alpha-Chloroxim der Formel Cl-C(R¹)₂-C(=NOH)R¹;
- (iii) einem alpha-Bromketon der Formel Br-C(R¹)₂-C(=O)R¹, gefolgt von Umwandlung des Diamindiketon-Produktes zum Diamindioxim mit Hydroxylamin.

[0062] Die Route (i) wird von S. Jurisson et al. [Inorg. Chem., 26, 3576–82 (1987)] beschrieben. Chlornitroso-Verbindungen können durch Behandlung des geeigneten Alkens mit Nitrosylchlorid (NOCl), wie es im Beispiel 3 beschrieben ist, erhalten werden. Weitere synthetische Details der Chlornitrosoverbindungen sind angegeben von: Ramalingam, K. et al. Synth. Comm. (1995) 25(5) 743–52; Glaser et al. J. Org. Chem. (1996), 61(3), 1047–48; Clapp, Leallyn B; et al. J. Org. Chem. (1971), 36(8) 1169–70; Saito, Giulichi et al. Shizen Kagaku (1995), 47, 41–9 und Schulz, Manfred Z. Chern (1981), 21(11), 404–5. Die Route (iii) wird in weiten Begriffen von Nowotnik et al. [Tetrahedron, 50(29), S. 8617–8632 (1994)] beschrieben. Alpha-Chloroxime können durch Oximierung des entsprechenden alpha-Chlorketons oder -aldehyds, die kommerziell erhältlich sind, erhalten werden. Alpha-Bromketone sind kommerziell erhältlich.

[0063] Wenn J für -NH₂ steht, kann das Triamin der Formel IV gegebenenfalls zuerst derart mono-geschützt werden, dass das primäre Amin der J-Gruppe geschützt wird. Das Diamindioxim wird dann gemäß der Routen (i), (ii) oder (iii), die oben angegeben sind, hergestellt, dann wird die Schutzgruppe entfernt. Geeignete Schutzgruppen sind in der Technik bekannt und umfassen BOC (d.h. tert.-Butoxycarbonyl) oder Fmoc, wie oben beschrieben.

[0064] Die Verbindungen der Formel IV werden geeigneterweise von HC(CH₂CH₂OAc)₃ durch Hydrolyseren einer oder mehrerer der Acetatester zu primärem(n) Alkohol(en) und Umwandeln zu einer Austrittsgruppe, wie einen Methansulfonatester, mit Methansulfonylchlorid und Pyridin, hergestellt. Diese Austrittsgruppe kann dann durch ein geeignetes Nukleophil ersetzt werden, das zur gewünschten Funktionalität umgewandelt werden kann. Um eine Carbonsäure (d.h. J = -CO₂H) zu erzeugen, würde ein Cyanidanion verwendet. Säurehyd-

rolyse des Cyanids würde die erwünschte Carbonsäure erzeugen. Um ein Amin zu erzeugen, würde ein Azid-Nukleophil verwendet werden, um ein Alkylazid zu erzeugen. Die Hydrierung des Alkylazids würde ein Amin erzeugen. Um ein Thiol zu erzeugen (d.h. J=SH) würde das Ersetzen der Austrittsgruppe mit einem Thiocessigsäureanion ein Thioacetat ergeben, das bei Säurehydrolyse das Thiol erzeugen würde.

[0065] In einem weiteren Aspekt stellt die vorliegende Erfindung eine Verbindung der Formel V bereit:



Formel V

wobei R⁷ und R⁸ unabhängig für H oder P^G stehen oder R⁷ oder R⁸ zusammen P^G bilden; oder ein Salz davon.

[0066] P^G ist eine Schutzgruppe wie oben definiert. Die Verbindungen der Formel V sind nützliche Precursor für einen Bereich von bifunktionellen Chelatoren der vorliegenden Erfindung. Eine bevorzugte Verbindung der Formel V ist HC(CH₂CH₂NH₂)₂(CH₂CH₂NR⁷R⁸), ein mono-geschütztes Triamin wie oben beschrieben. Am meisten bevorzugt stehen all die R⁷- und R⁸-Gruppen für H, d.h. die Verbindung HC(CH₂CH₂NH₂)₃ oder ein Säuresalz davon ist eine bevorzugte Verbindung der vorliegenden Erfindung.

[0067] [Fig. 1](#) zeigt die chemischen Strukturen der Verbindungen 1 und 6. [Fig. 2](#) zeigt die chemische Struktur der Verbindung 5 vollständig. [Fig. 3](#) zeigt das Reaktionsschema für die Azidsynthese von 1,1',1-Tris(2-aminoethyl)amin des Beispiels 1. [Fig. 4](#) zeigt das Reaktionsschema für die alternative Synthese von 1,1,1-Tris(2-aminoethyl)amin des Beispiels 2.

[0068] Die Erfindung wird durch die nicht-beschränkenden Beispiele, die unten detailliert angegeben werden, veranschaulicht. Beispiel 1 beschreibt die Synthese der neuen Verbindung 1,1,1-Tris(2-aminoethyl)methan. Beispiel 2 liefert eine alternative Synthese von 1,1,1-Tris(2-aminoethyl)methan, die die Verwendung von möglicherweise schädlichen Azid-Zwischenprodukten vermeidet. Beispiel 3 beschreibt die Synthese von verschiedenen Chlornitrosoalkan-Precursoren. Beispiel 4 beschreibt die Synthese eines bevorzugten Amin-substituierten bifunktionellen Diamindioxims der vorliegenden Erfindung (Verbindung 1). Beispiel 5 beschreibt die Synthese eines Benzamid-Konjugats (Verbindung 2) der Verbindung 1. Beispiel 6 zeigt, wie eine Spacer-Gruppe eingeführt werden kann, die die terminale Aminfunktion des bifunktionellen Chelators zu einer terminalen Carboxylfunktion effektiv umwandelt. Beispiel 7 beschreibt die Festphasensynthese eines Thrombus-Targeting-peptids. Beispiel 8 liefert die Synthese der Verbindung 5, d.h. ein Konjugat der Verbindung 1 mit einem Targetingpeptid. Beispiel 9 beschreibt die Synthese der Verbindungen 7 und 8, die Diamindioxim-Analoga sind, die Ringstrukturen eingebaut haben.

[0069] Beispiel 10 vergleicht das ^{99m}Tc-Radiomarkieren der Verbindung 2 mit jenem des Aza-Analogen-Chelators des Stands der Technik (Verbindung 3), und zeigt, dass die Chelatoren der vorliegenden Erfindung viel effizienteres und schnelleres Markieren unter milderer Bedingungen ergeben, d.h. Raumtemperatur und bei weniger alkalischem pH. Daher erfordert der Chelator des Stands der Technik den pH 10 und eine Zeit von mindestens 120 min bei Raumtemperatur, um RCP's von über 80% zu ergeben, wohingegen die Verbindung 3 bei über 95% RCP innerhalb von 15 min. markiert. Beispiel 11 zeigt, dass die Verbindung 5 mit ^{99m}Tc-markiert, um ein Präparat einer hohen radiochemischen Reinheit zu ergeben. Beispiel 12 zeigt, dass die ^{99m}Tc-markierte Verbindung 5 in vitro eine mit der ^{99m}Tc-Verbindung 6 des Stands der Technik vergleichbare Blutgerinnselaufnahme zeigt, und dass daher die biologischen Targetingeigenschaften des Peptids erhalten bleiben, wenn es an die Diamindioxim-Chelatoren der vorliegenden Erfindung konjugiert ist. Beispiel 13 zeigt die ^{99m}Tc-Radiomarkierung der Verbindung 9, die ein Konjugat der Verbindung 1 mit einem cyclischen Peptid ist, das relativ empfindliche Disulfidverbindungen besitzt, unter milden Bedingungen.

Beispiel 1: Synthese von 1,1,1-Tris(2-aminoethyl)methan

Schritt 1(a): 3(Methoxycarbonylmethylen)glutarsäuredimethylester

[0070] Carbomethoxymethylentriphenylphosphoran (167g, 0,5 mol) in Toluol (600 ml) wurde mit Dimethyl-3-oxoglutarat (87 g, 0,5 mol) behandelt und die Reaktion wurde auf 100°C auf einem Ölbad bei 120°C unter einer Atmosphäre von Stickstoff 36 h lang erwärmt. Die Reaktion wurde dann in vacuo konzentriert und der ölige Rückstand mit 40/60 Petrolether/Diethylether 1:1, 600 ml verrieben. Triphenylphosphinoxid fiel aus und die überstehende Flüssigkeit wurde dekantiert/abgefiltert. Der Rückstand bei Verdampfung in vacuo wurde Kugelrohr-destilliert unter Hochvakuum-Sdp. (Ofentemperatur 180–200°C bei 26,66 Pa, d.h. 0,2 Torr), um 3-(Methoxycarbonylmethylen)glutarsäuredimethylester (89,08 g, 53%) zu ergeben.

NMR¹H(CDCl₃): δ 3,31 (2H, s, CH₂), 3,7 (9H, s, 3 × OCH₃), 3,87 (2H, s, CH₂), 5,79 (1H, s, =CH₂) ppm.

NMR¹³C(CDCl₃), δ 36–56, CH₃, 48,7, 2 × CH₃, 52,09 and 52,5 (2 × CH₂); 122,3 und 146,16 C=CH; 165,9, 170,0 und 170,5 3 × COO ppm.

Schritt 1 (b): Hydrierung von 3-(Methoxycarbonylmethylen)glutarsäure-dimethylester

[0071] 3-(Methoxycarbonylmethylen)glutarsäure-dimethylester (89 g, 267 mmol) in Methanol (200 ml) wurde mit (10% Palladium auf Aktivkohle: 50% Wasser) (9 g) unter einer Atmosphäre von Wasserstoffgas (3,5 × 10⁵ Pa oder 3,5 bar) (30 h lang) geschüttelt.

[0072] Die Lösung wurde durch Kieselgur abgefiltert und in vacuo konzentriert, um 3-(Methoxycarbonylmethyl)glutarsäure-dimethylester als ein Öl zu ergeben (Ausbeute 84,9 g, 94%).

NMR¹H(CDCl₃): δ 2,48 (6H, d, J=8Hz, 3 × CH₂), 2,78 (1H, Hextett, J= 8Hz CH₂) 3,7 (9H, s, 3 × CH₃).

NMR¹³C(CDCl₃), δ 28,6, CH; 37,50, 3 × CH₃, 51,6, 3 × CH₂; 172,28, 3 × COO.

Schritt 1 (c): Reduktion und Veresterung des Trimethylesters zum Triacetat

[0073] Unter einer Stickstoffatmosphäre in einem 2l-Dreihalsrundkolben wurde Lithiumaluminiumhydrid (20 g, 588 mmol) in Tetrahydrofuran (400 ml) vorsichtig mit Tris(methyloxycarbonylmethyl)methan (40 g, 212 mmol) in Tetrahydrofuran (200 ml) über eine Stunde behandelt. Eine stark exotherme Reaktion erfolgte, was verursachte, dass das Lösungsmittel stark unter Rückfluß kochte. Die Reaktion wurde auf einem Ölbad bei 90°C unter Rückfluß drei Tage lang erwärmt. Die Reaktion wurde durch die vorsichtige tropfenweise Zugabe von Essigsäure (100 ml) gequencht, bis die Entwicklung von Wasserstoff aufhörte. Die gerührte Reaktionsmischung wurde vorsichtig mit Essigsäureanhydridlösung (500 ml) bei einer derartigen Geschwindigkeit behandelt, dass ein sanftes Rückflusskochen verursacht wurde. Der Kolben wurde für die Destillation ausgerüstet und gerührt und dann bei 90°C (Ölbadtemperatur) erwärmt, um das Tetrahydrofuran herauszudestillieren. Eine weitere Portion Essigsäureanhydrid (300 ml) wurde zugegeben, die Reaktion wurde zur Rückflusskonfiguration zurückgebracht und gerührt und in einem Ölbad bei 140°C 5 h lang erwärmt. Man ließ die Reaktion kühlen und filtrierte. Das Aluminiumoxid-Präzipitat wurde mit Ethylacetat gewaschen und die kombinierten Filtrate auf einem Rotationsverdampfer bei Wasserbadtemperatur von 50°C in vacuo (666,6 Pa oder 5 mmHg) konzentriert, um ein Öl zu ergeben. Das Öl wurde in Ethylacetat (500 ml) aufgenommen und mit gesättigter wässriger Kaliumcarbonatlösung gewaschen. Die Ethylacetatlösung wurde getrennt, über Natriumsulfat getrocknet und in vacuo konzentriert, um ein Öl zu ergeben. Das Öl wurde Kugelrohr-destilliert in Hochvakuum, um Tris(2-acetoxyethyl)methan (45,3 g, 95,9%) als ein Öl zu ergeben. Sdp. 200°C bei 13,33 Pa, d.h. 0,1 mmHg.

NMR¹H(CDCl₃): δ 1,66(7H, m, 3 × CH₂, CH), 2,08 (1H, s, 3 × CH₃); 4,1 (6H, t, 3 × CH₂O).

NMR¹³C(CDCl₃), δ 20,9, CH₃; 29,34, CH; 32,17, CH₂; 62,15, CH₂O; 171,CO.

Schritt 1 (d): Entfernung von Acetat-Gruppen vom Triacetat

[0074] Tris(2-acetoxyethyl)methan (45,3 g, 165 mM) in Methanol (200 ml) und 880-Ammoniak (100 ml) wurde auf einem Ölbad bei 80°C zwei Tage lang erwärmt. Die Reaktion wurde mit einer weiteren Portion 880-Ammoniak (50 ml) behandelt und bei 80°C in einem Ölbad 24 h lang erwärmt. Eine weitere Portion 880-Ammoniak (50 ml) wurde zugegeben, und die Reaktion bei 80°C 24 h lang erwärmt. Die Reaktion wurde dann in vacuo konzentriert, um alle Lösungsmittel zu entfernen, um ein Öl zu ergeben. Dies wurde aufgenommen in 880-Ammoniak (150 ml) und bei 80°C 24 h lang erwärmt. Die Reaktion wurde dann in vacuo konzentriert, um alle Lösungsmittel zu entfernen, um ein Öl zu ergeben. Kugelrohrdestillation ergab ein Acetamid Sdp. 170–180, 26,66 Pa (0,2 mmHg). Die Kolben, die das Acetamid enthielten, wurden sauber gewaschen und die Destillation fortgesetzt. Tris(2-hydroxyethyl)methan (22,53 g, 92%) destillierte beim Sdp. 220°C, 26,66 Pa (0,2 mmHg).

NMR¹H(CDCl₃): δ 1,45(6H, q, 3 × CH₂) 2,2 (1H, Quintett, CH); 3,7 (6H, t 3 × CH₂OH); 5,5 (3H, brs, 3 × OH).

NMR¹³C(CDCl₃), δ 22,13, CH; 33,95, 3 × CH₂; 57,8, 3 × CH₂OH.

Schritt 1 (e): Umwandlung des Triols zum Tris(methansulfonat)

[0075] Zu einer gerührten, Eis-gekühlten Lösung von Tris(2-hydroxyethyl)methan (10 g, 0,0676 mol) in Dichlormethan (50 ml) wurde eine Lösung von Methansulfonylchlorid (40 g, 0,349 mol) in Dichlormethan (50 ml) unter Stickstoff bei einer derartigen Geschwindigkeit langsam zugetropft, dass die Temperatur nicht über 15°C anstieg. Pyridin (21,4 g, 0,27 mol, 4 eq), aufgelöst in Dichlormethan (50 ml) wurde dann tropfenweise bei einer derartigen Geschwindigkeit zugegeben, dass die Temperatur nicht über 15°C anstieg, exotherme Reaktion. Die Reaktion wurde stehengelassen, um bei Raumtemperatur 24 h lang gerührt zu werden, und dann mit 5 N Salzsäurelösung (80 ml) behandelt und die Schichten wurden getrennt. Die wässrige Schicht wurde mit weiterem Dichlormethan (50 ml) extrahiert und die organischen Extrakte kombiniert, über Natriumsulfat getrocknet,

gefiltert und in *vacuo* konzentriert, um Tris[2-(methylsulfonyloxy)ethyl]methan, kontaminiert mit überschüssigem Methansulfonylchlorid, zu ergeben. Die theoretische Ausbeute betrug 25,8 g.

NMR¹H(CDCl₃): δ 4,3 (6H, t, 2 × CH₂), 3,0 (9H, s, 3 × CH₃), 2 (1H, Hextett, CH), 1,85 (6H, q, 3 × CH₂).

Schritt 1 (f): Herstellung von 1,1,1-Tris(2-acidoethyl)methan

[0076] Eine gerührte Lösung von Tris[2-(methylsulfonyloxy)ethyl]methan [aus Schritt 1 (e), kontaminiert mit überschüssigem Methylsulfonylchlorid] (25,8 g, 67 mmol, theoretisch) in trockenem DMF (250 ml) unter Stickstoff wurde mit Natriumazid (30,7 g, 0,47 mol) portionsweise über 15 min behandelt. Eine exotherme Reaktion wurde beobachtet und die Reaktion wurde auf einem Eisbad gekühlt. Nach 30 min wurde die Reaktionsmischung auf einem Ölbad bei 50°C 24 h lang erwärmt. Die Reaktion wurde in der Farbe braun. Man ließ die Reaktion abkühlen, behandelte sie mit verdünnter Kaliumcarbonatlösung (200 ml) und extrahierte dreimal mit 40/60 Petrolether/Diethylether 10:1 (3 × 150 ml). Die organischen Extrakte wurden mit Wasser (2 × 150 ml) gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und gefiltert. Ethanol (200 ml) wurde zu der Petrol/Ether-Lösung gegeben, um das Triazid in Lösung zu behalten und das Volumen wurde in *vacuo* auf nicht weniger als 200 ml reduziert. Ethanol (200 ml) wurde zugegeben und in *vacuo* konzentriert, um die letzten Spuren von Petrol zu entfernen, wobei nicht weniger als 200 ml der ethanolischen Lösung hinterlassen wurde. Die Ethanolösung des Triazids wurde direkt in Schritt 1 (g) verwendet.

[0077] VORSICHT: ENTFERNE NICHT DAS GESAMTE LÖSUNGSMITTEL, DA DAS AZID MÖGLICHERWEISE EXPLOSIV IST UND IMMER IN VERDÜNNTER LÖSUNG GEHALTEN WERDEN SOLLTE.

[0078] Weniger als 0,2 ml der Lösung wurde in Vakuum verdampft, um das Ethanol zu entfernen, und eine NMR wurde mit dieser kleinen Probe ausgeführt:

NMR¹H(CDCl₃): δ 3,35 (6H, t, 2 × CH₂), 1,8 (1H, Septett, CH), 1,6 (6H, q, 3 × CH₂).

Schritt 1 (g): Herstellung von 1,1,1-Tris(2-aminoethyl)methan

[0079] Tris(2-azidoethyl)methan (15,06 g, 0,0676 mol) (angenommene 100%-ige Ausbeute der vorstehenden Reaktion) in Ethanol (200 ml) wurde mit 10% Palladium auf Aktivkohle (2 g, 50% Wasser) behandelt und 12 h lang hydriert. Das Reaktionsgefäß wurde alle 2 h evakuiert, um Stickstoff, der aus der Reaktion entwickelt wurde, zu entfernen und mit Wasserstoff wieder gefüllt. Eine Probe wurde für die NMR-Analyse entnommen, um die vollständige Umwandlung des Triazids zum Triamin zu bestätigen.

[0080] Vorsicht: Unreduziertes Azid könnte bei der Destillation explodieren. Die Reaktion wurde durch einen Celite-Filterkuchen gefiltert, um den Katalysator zu entfernen und in *vacuo* konzentriert, um Tris(2-aminoethyl)methan als ein Öl zu ergeben. Dies wurde weiter durch Kugelrohrdestillation Sdp. 180–200°C bei 53,32 Pa oder 0,4 mm/Hg gereinigt, um ein farbloses Öl zu ergeben (8,1 g, 82,7% Gesamtausbeute des Triols).

NMR¹H(CDCl₃): δ 2,72 (6H, t, 3 × CH₂N), 1,41 (H, Septett, CH); 1,39 (6H, q 3 × CH₂).

NMR¹³C(CDCl₃), δ 39,8 (CH₂NH₂), 38,2 (CH₂), 31,0 (CH).

Beispiel 2: Alternative Herstellung von 1,1,1-Tris(2-aminoethyl)methan

Schritt 2 (a): Amidierung des Trimethylesters mit p-Methoxybenzylamin

[0081] Tris-(methyloxycarbonylmethyl)methan [2 g, 8,4 mmol; hergestellt wie in Schritt 1 (b) oben] wurde in p-Methoxybenzylamin (25 g, 178,6 mmol) aufgelöst. Die Apparatur wurde für die Destillation eingerichtet und auf 120°C 24 h lang unter Stickstofffluss erwärmt. Das Fortschreiten der Reaktion wurde durch die Menge des gesammelten Methanols überwacht. Die Reaktionsmischung wurde auf Umgebungstemperatur gekühlt und 30 ml Ethylacetat wurde zugegeben, dann wurde das präzipitierte Triimid-Produkt 30 min lang gerührt. Das Triimid wurde durch Filtration isoliert und der Filterkuchen wurde mehrere Male mit ausreichenden Mengen Ethylacetat gewaschen, um überschüssiges p-Methoxybenzylamin zu entfernen. Nach dem Trocknen wurden 4,6 g, 100%, eines weißen Pulvers erhalten. Das stark unlösliche Produkt wurde direkt im nächsten Schritt ohne weitere Reinigung oder Charakterisierung verwendet.

Schritt 2 (b): Herstellung von 1,1,1-Tris[2-(p-methoxybenzylamino)ethyl]methan

[0082] In einem 1000 ml-Dreihals-Rundkolben, der in einem Eisswasserbad gekühlt war, wird das Triimid aus Schritt 2 (a) (10 g, 17,89 mmol) vorsichtig zu 250 ml 1 M Boranlösung (3,5 g, 244,3 mmol) Boran gegeben. Nach der vollständigen Zugabe wird das Eisswasserbad entfernt und die Reaktionsmischung langsam auf 60°C er-

wärmt. Die Reaktionsmischung wird bei 60°C 20 h lang gerührt. Eine Probe der Reaktionsmischung (1 ml) wurde entzogen und mit 0,5 ml 5H HCl gemischt und 30 min stehengelassen. Zu der Probe wurde 0,5 ml 50-NaOH zugegeben, gefolgt von 2 ml Wasser, und die Lösung wurde gerührt, bis das gesamte weiße Präzipitat aufgelöst war. Die Lösung wurde mit Ether (5 ml) extrahiert und verdampft. Der Rückstand wurde in Acetonitril bei einer Konzentration von 1 mg/ml aufgelöst und durch MS analysiert. Falls Mono- und Diamid ($M + H/z = 520$ und 534) im MS-Spektrum gesehen werden, ist die Reaktion nicht abgeschlossen. Um die Reaktion abzuschließen, werden weitere 100 ml 1M Boran-THF-Lösung zugegeben, und die Reaktionsmischung für 6 weitere Stunden bei 60°C gerührt und eine neue Probe entzogen, worauf die vorstehende Probennahmeprozedur folgte. Weitere Zugabe des 1M Boran in THF-Lösung wird fortgesetzt, wenn notwendig, bis es eine vollständige Umwandlung zum Triamin gibt.

[0083] Die Reaktionsmischung wird auf Umgebungstemperatur gekühlt und 5N HCl wird langsam zugegeben [VORSICHT: kräftige Schaumbildung tritt auf!]. HCl wird zugegeben, bis keine Gasentwicklung mehr beobachtet wird. Die Mischung wird 30 min lang gerührt und dann verdampft. Der Kuchen wird in wässriger NaOH-Lösung (20–40%; 1:2 g/v) suspendiert und 30 min lang gerührt. Die Mischung wird dann mit Wasser (3 Volumina) verdünnt. Die Mischung wird dann mit Diethylether (2×150 ml) extrahiert [VORSICHT: Verwende nicht halogenierte Lösungsmittel]. Die kombinierten organischen Phasen wurden dann mit Wasser (1×200 ml), Salzlösung (150 ml) gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Ausbeute nach der Verdampfung: 7,6 g, 84% als Öl.

$\text{NMR}^1\text{H}(\text{CDCl}_3): \delta$ 1,45 (6H, m, $3 \times \text{CH}_2$, 1,54 (1H, Septett, CH); 2,60 (6H, t, $3 \times \text{CH}_2\text{N}$); 3,68 (6H, s, ArCH_2); 3,78 (9H, s, $3 \times \text{CH}_3\text{O}$); 6,94 (6H, d, $6 \times \text{Ar}$), 7,20 (6H, d, $6 \times \text{Ar}$).

$\text{NMR}^{13}\text{C}(\text{CDCl}_3)$, δ 32,17, CH; 34,44, CH_2 ; 47,00 CH_2 , 53,56. ArCH_2 ; 55,52, CH_3O ; 113,78, Ar; 129,29, Ar; 132,61; Ar; 158,60 Ar.

Schritt 2 (c): Herstellung von 1,1,1-Tris(1-aminoethyl)methan

[0084] 1,1,1-Tris[2-(p-methoxybenzylamino)ethyl]methan (20,0 g, 0,036 mol) wurden in Methanol (100 ml) aufgelöst und $\text{Pd}(\text{OH})_2$ (5,0 g) wurde zugegeben. Die Mischung wurde hydriert (3×10^5 Pa oder 3 bar, 100°C in einem Autoklaven) und 5 h lang gerührt. $\text{Pd}(\text{OH})_2$ wurde in zwei weiteren Portionen (2×5 g) nach 10 bzw. 15 h zugegeben.

[0085] Die Reaktionsmischung wurde gefiltert und das Filtrat wurde mit Methanol gewaschen. Die kombinierte organische Phase wurde verdampft und der Rückstand wurde unter Vakuum destilliert (1×10^{-2} , 110°C), um 2,60 g (50%) 1,1,1-Tris(2-aminoethyl)methan zu ergeben, das mit dem vorstehend beschriebenen Beispiel 1 identisch war.

Beispiel 3: Herstellung von 3-Chlor-3-methyl-2-nitrosobutan

[0086] Eine Mischung von 2-Methylbut-2-en (147 ml, 1,4 mol) und Isoamylnitrit (156 ml, 1,16 mol) wurde auf –30°C in einem Bad von Cardice und Methanol gekühlt und kräftig mit einem Überkopf-Luftrührer gerührt und tropfenweise mit konzentrierter Salzsäure (140 ml, 1,68 mol) bei einer derartigen Geschwindigkeit behandelt, dass die Temperatur unter –20°C gehalten wurde. Dies erfordert ungefähr 1 h, da es eine signifikante exotherme Reaktion gibt und Vorsicht eingehalten werden muss, um Überheizen zu verhindern. Ethanol (100 ml) wurde zugegeben, um die Viskosität des Schlammes, der am Ende der Zugabe gebildet war, zu verringern, und die Reaktion wurde bei –20 bis –10°C für weitere 2 h zum Vervollständigen der Reaktion gerührt. Das Präzipitat wurde durch Filtration unter Vakuum gesammelt und mit 4×30 ml kaltem (–20°C) Ethanol und 100 ml eiskaltem Wasser gewaschen und in vacuo getrocknet, um 3-Chlor-3-methyl-2-nitrosobutan als einen weißen Feststoff zu ergeben. Das Ethanolfiltrat und die Waschflüssigkeiten wurden kombiniert und mit Wasser (200 ml) verdünnt und gekühlt und man ließ sie 1 h lang bei –10°C stehen, wenn ein weiteres Kristallisierungsprodukt von 3-Chlor-3-methyl-2-nitrosobutan auskristallisierte. Das Präzipitat wurde durch Filtration gesammelt und mit dem Minimum Wasser gewaschen und in vacuo getrocknet, um eine Gesamtausbeute von 3-Chlor-3-methyl-2-nitrosobutan (115 g, 0,85 mol, 73%) >98% rein durch NMR zu ergeben.

$\text{NMR}^1\text{H}(\text{CDCl}_3)$, als eine Mischung von Isomeren (Isomer 1, 90%), 1,5 d, (2H, CH_3), 1,65 d, (4H, $2 \times \text{CH}_3$), 5,85, q, und 5,95, q, zusammen 1H. (Isomer 2, 10%), 1,76 s, (6H, $2 \times \text{CH}_3$), 2,07 (3H, CH_3).

[0087] 1-Chlor-1-(1-nitrosoethyl)cyclopentan wurde in einer analogen Weise aus Ethyldencyclopentan hergestellt (Ausbeute 55%) [J. Org. Chem., 36 (8), Seiten 1169–70].

[0088] 1-Chlor-1-(1-nitrosoethyl)cyclohexan wurde in einer analogen Weise aus Ethyldencyclohexan hergestellt (Ausbeute 63%) [J. Org. Chem., 36(8), Seite 1169–70].

$\delta_{\text{H}}(\text{CDCl}_3; 270 \text{ MHz})$, 1,52 (3H, d $J_{\text{HH}} 7\text{Hz}$, CH_3), 1,48–2,20 (10H, m, $\text{CH}_2 \times 5$), 5,96 (1H, q, $J_{\text{HH}} 7\text{Hz}$, CH).

[0089] 1-Chlor-1-methyl-2-nitrosocyclohexan wurde in einer analogen Weise aus 1-Methyl-1-cyclohexen hergestellt (Ausbeute 57%) [Ind. J. Chem. Sect. B (1978) 16B(10) 917–20, Z. Chem. (1981), 21(11)404–5, J. Pract. Chem. (1978) 320 (3) 433–51].

$\delta_{\text{H}}(\text{CDCl}_3; 270 \text{ MHz})$, 1,41–2,28 (11H, m, CH_3 , $\text{CH}_2 \times 4$), 5,72–5,79 (1H, m, CH).

Beispiel 4: Synthese von Bis[N-(1,1-dimethyl-2-N-hydroxyiminpropyl)2-aminoethyl]-2-aminoethyl]methan (Verbindung 1)

[0090] Zu einer Lösung von Tris(2-aminoethyl)methan (4,047 g, 27,9 mmol) in trockenem Ethanol (30 ml) wurde wasserfreies Kaliumcarbonat (7,7 g, 55,8 mmol, 2 eq) bei Raumtemperatur unter kräftigem Rühren unter einer Stickstoffatmosphäre gegeben. Eine Lösung von 3-Chlor-3-methyl-2-nitrosobutan (7,56 g, 55,8 mol, 2 eq) wurde in trockenem Ethanol (100 ml) aufgelöst und 75 ml dieser Lösung wurden langsam in die Reaktionsmischung getropft. Der Reaktion folgte TLC auf Silica [Platten liegen in Dichlormethan, Methanol, konzentriertem (0,88 sg) Ammoniak; 100/30/5 und die TLC-Platte wurde durch Sprühen mit Ninhydrin und erwärmen entwickelt]. Die mono-, di-, und tri-alkylierten Produkte wurden mit RFs gesehen, die in dieser Reihenfolge anstiegen. Analytische HPLC ließ man unter Verwenden einer RPR-Umkehrphasensäule in einem Gradienten von 7,5–75% Acetonitril in 3% wässrigem Ammoniak laufen. Die Reaktion wurde in *vacuo* konzentriert, um das Ethanol zu entfernen, und in Wasser (110 ml) resuspendiert. Der wässrige Schlamm wurde mit Ether (100 ml) extrahiert, um etwas von der tri-alkylierten Verbindung und lipophilen Verunreinigungen zu entfernen, wodurch das mono- und das erwünschte di-alkylierte Produkt in der Wasserschicht verblieb. Die wässrige Lösung wurde mit Ammoniumacetat (2 eq, 4,3 g, 55,8 mmol) gepuffert, um eine gute Chromatographie sicherzustellen. Die wässrige Lösung wurde bei 4°C über Nacht gelagert, bevor sie durch automatisierte préparative HPLC gereinigt wurde.

Ausbeute (2,2 g, 6,4 mmol, 23%).

Massen-Spektrometrie; 10 V positive Cone Voltage. gefunden: 344; Berechnet: M + H = 344.

$\text{NMR}^1\text{H}(\text{CDCl}_3)$: δ 1,24 (6H, s, $2 \times \text{CH}_3$), 1,3 (6H, s, $2 \times \text{CH}_3$), 1,25–1,75 (7H, m, $3 \times \text{CH}_2\text{CH}$), (3H, s, $2 \times \text{CH}_2$), 2,58 (4H, m, CH_2N), 2,88 (2H, t, CH_2N_2), 5,0 (6H, s, NH_2 , $2 \times \text{NH}$, $2 \times \text{OH}$).

$\text{NMR}^1\text{H}((\text{CD}_3)_2\text{SO})$ δ 1,1 4 $\times \text{CH}$; 1,29, 3 $\times \text{CH}_2$; 2,1 (4H, t, $2 \times \text{CH}_2$);

$\text{NMR}^{13}\text{C}((\text{CDI}_3)_2\text{SO})$ δ 9,0 (4 $\times \text{CH}_3$), 25,8 (2 $\times \text{CH}_3$), 31,0 2 $\times \text{CN}_2$, 34,6 CH_2 , 56,8 2 $\times \text{CH}_2\text{N}$; 160,3, C=N.

HPLC-Bedingungen: Fließgeschwindigkeit 8ml/min unter Verwenden einer 25 mm-PRP-Säule

A = 3% Ammoniaklösung (relative Dichte=0,88)/Wasser.

B = Acetonitril

Zeit	%B
0	7,5
15	75,0
20	75,0
22	7,5
30	7,5

Lade 3 ml wässriger Lösung pro Durchlauf und sammle in einem Zeitfenster von 12,5–13,5 min.

Beispiel 5: Die Herstellung der Verbindung 2 - das Benzamidkonjugat der Verbindung 1

[0091] Verbindung 1 (0,5 g, 1,45 mmol) in trockenem Acetonitril (50 ml) und Triethylamin (150 mg, 1,45 mmol) unter einer Stickstoffatmosphäre wurde auf einem Eisbad auf 0°C gekühlt. Benzoesäureanhydrid (330 mg, 1,45 mmol) wurde zur gerührten Reaktion gegeben und man ließ sie auf Raumtemperatur erwärmen und zum Rühren über Nacht stehen. Das Acetonitril wurde in *vacuo* entfernt und der Rückstand in (50 ml) Dichlormethan wieder aufgelöst, mit wässrigem Kaliumcarbonat (2 \times 50 ml) gewaschen, getrennt und über Natriumsulfat getrocknet. Die wässrige Kaliumcarbonatlösung wurde mit Dichlormethan (2 \times 50 ml) extrahiert, über Natriumsulfat getrocknet und die kombinierten Dichlormethan-Extrakte in *vacuo* zu einem Gummi konzentriert. Analytische HPLC zeigte an, dass das Produkt nicht so rein wie erforderlich war und das Material wurde deshalb durch automatisierte préparative HPLC gereinigt, was die Verbindung 2 ergab. Das Produkt wurde als ein Spot auf sowohl TLC und analytischer HPLC analysiert.

HPLC-Bedingungen: Fließgeschwindigkeit 8ml/min unter Verwenden einer 150 mm × 25 mm PRP-Säule;
 Die Probe war in 2 ml 30%-igem Ethanolwasser pro Durchlauf geladen.
 A = 3% Ammoniaklösung (relative Dichte=0,88)Wasser.
 B = Acetonitril

Zeit	%B
0	7,5
15	75,0
20	75,0
22	7,5
30	7,5

[0092] Das erforderliche Produkt eluierte bei 15,25–16,5 min. Die Produktlösung wurde in *vacuo* verdampft, um (304 mg, 0,68 mmol, 47%) eines farblosen glasigen Schaums Smp. 55°C zu ergeben.
 $\text{NMR}^1\text{H}(\text{CDCl}_3)$, 1,26 (12H, s, 4 × CH_3), 1,43 (2H, m, CH_2), 1,57 (4H, m, CH_2), 1,75 (1H, m, CH), 1,823 (6H, s, 2 × CH_3), 2,58, (4H, m, 2 × CH_2N), 3,56 (2H, m, CN_2NHCO), 6,95 (1H, m, NHCO), 7,42 (3H, m, 3 × ArH) 7,79 (2H, d, ArH).
 $\text{NMR}^{13}\text{H}(\text{CDCl}_3)$ 10,09, 25,7, 26,1, 28,5, 32,8, 33,3, 37,93, 57,57 127,0 128,4, 131,4, 158,98, 168,15.
 M/S $\text{C}_{24}\text{H}_{41}\text{N}_5\text{O}_3\text{M} + \text{H} = 448$ gefunden 448
 RF 0,8 in 100:30:5/ CH_2Cl_2 :MeOH:880 Ammoniak, sichtbar gemacht mit Ninhydrin.

Beispiel 6: Synthese von Bis[(1,1-dimethyl-2-N-hydroxyiminpropyl)2-aminoethyl]-(2-lutarylaminid)ethyl)methan
 [Verbindung 4; das Glutarylaminid-Derivat der Verbindung 1]

[0093] Verbindung 1 (0,5 g, 1,45 mmol) in trockenem Acetonitril (50 ml) und Triethylamin (150 mg, 1,45 mmol) unter einer Stickstoffatmosphäre wurde auf einem Eisbad auf 0°C gekühlt. Glutarsäureanhydrid (165 mg, 1,45 mmol) wurde zur gerührten Reaktion gegeben und man ließ sie auf Raumtemperatur erwärmen und zum Rühren über Nacht stehen. Das Präzipitat, dass sich über Nacht bildete, wurde durch Filtration gesammelt und in *vacuo* getrocknet, um eine unreine Probe der Titelverbindung zu ergeben (267 mg, 0,583 mmol, 40%). Das Filtrat wurde in *vacuo* konzentriert, um ein farbloses Glas zu ergeben, das zusammen mit dem Präzipitat, das gesammelt worden war, in 5% 0,880 sg Ammoniak, Wasser (50 ml) wieder aufgelöst und durch automatisierte präparative HPLC gereinigt wurde.

HPLC-Bedingungen: Fließgeschwindigkeit 8 ml/min, unter Verwenden einer 150 mm × 25 mm-PRP-Säule
 Die Probe war in 2 ml der Lösung pro Durchlauf geladen.

A = 3% Ammoniaklösung (relative Dichte=0,88)Wasser
 B = Acetonitril

Zeit	%B
0	7,5
15	75,0
20	75,0
22	7,5
31	7,5

[0094] Das erforderliche Produkt eluierte bei 15,25–16,5 min. Die Produktlösung wurde in *vacuo* verdampft, um (304 mg, 0,68 mmol, 47%) eines farblosen glasigen Schaumes Smp. 54,8°C zu ergeben. Das Produkt wurde als ein Spot sowohl auf TLC als auch auf analytischer HPLC analysiert.

$\text{NMR}^1\text{H}(\text{DMSO})$, 0,7 (12H, s, 4 × CH_3), 0,85 (4H, m, 2 × CH_2), 1,0 (1H, m, CH), 1,3 (6H, s, 2 × CH_3), 1,3 (4H, m, 2 × CH_2), 1,6 (2H, m, CH_2), 1,75 (6, m, 3 × CH_2), 2,6 (2, m, 2 × OH) 3,2 (2H, t, NH) 7,3 (1H, t, NH).
 $\text{NMR}^{13}\text{H}(\text{CD}_3\text{SO})$ 8,97, 20,51, 20,91, 25,09, 25,60, 31,06, 33,41, 33,86, 56,89, 66,99 160,07, 1712,34, 174,35 174,56
 M/S $\text{C}_{24}\text{H}_{43}\text{N}_5\text{O}_5\text{M} + \text{N} = 457$ gefunden 457,6

Beispiel 7: Synthese des geschützten Peptids Ac-NQEQQVSP(3I)YTLLKG

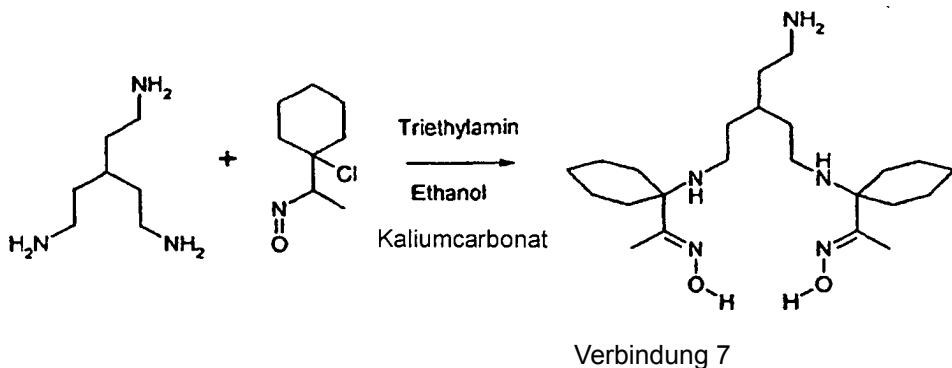
[0095] Das geschützte Peptid Ac-Asn(Trt)-Gln(Trt)-Glu(Ot-Bu)-Gln(Trt)-Val-Ser(tBu)-Pro-Tyr(3I)-Thr(tBu)-Leu-Leu-Lys(Boc)-Gly-OH wurde auf einem 2-Chlortriptyl-Festphasenharz durch Verankern von Fmoc-Gly- an das Harz und dann sukzessive Entschützung/Kopplungs-Zyklen mit den geeigneten geschützten Aminosäuren und den Kopplungsreagentien DCCI und HOBt angebaut. Das terminale Asparagin wird acetyliert, vom Harz unter Verwenden von 0,5% TFA gespalten und das Peptid wurde ohne weitere Reinigung verwendet.

Beispiel 8: Synthese der Verbindung 5 - Ein Peptidkonjugat der Verbindung 1

[0096] Das geschützte Ac-NQEQQVSPY(3I)TLLKG-Peptid des Beispiels 7 wurde vom Festphasenharz gespalten und dann mit der Verbindung 1 in Lösung unter Verwenden von Benzotriazol-1-yl-oxytris-pyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat und 1-Hydroxybenzotriazol als die Kopplungsmittel gekoppelt. Verbindung 5 wurde durch Entschützung im Reagens K erhalten (Reagens K ist 82,5% TFA, 5% Phenol, 5% veredeltes Wasser, 5% Thioanisol, 2,5% Ethandithiol). Das rohe Peptid wurde zuerst durch RP-HPLC unter Verwenden von TFA, gefolgt von einer zweiten Reinigung und Salzaustausch mit Essigsäure, Lyophilisierung, Filtration mit einem 0,22 μ -Filter und einer schließlichen Lyophilisierung gereinigt, um die Verbindung 5 zu ergeben.

[0097] Das Aza-diamindioxim-Chelatkonjugat nach dem Stand der Technik (Verbindung 6 – s. [Fig. 1](#)) desselben Peptids, d.h. Ac-NQEQQVSPY(3I)TLLKG wurde auf dieselbe Weise zum Vergleich hergestellt.

Beispiel 9: Herstellung von 1-(1-{3-(2-Aminoethyl)-5-[1-(1-hydroxyiminoethyl)cyclohexylaminolpentylamino}cyclohexyl)ethanondioxim [Verbindung 7]



[0098] Zu einer Lösung von 1,1,1-Tris-(2-aminoethyl)methan (0,96 g, 6,6 mmol) in trockenem Ethanol (7,5 ml) wurde Kaliumcarbonat (wasserfrei) (1,8 g, 13 mmol) und Triethylamin (1,33 g, 13 mmol) bei Raumtemperatur mit kräftigem Rühren unter einer Stickstoffatmosphäre zugegeben. Eine Lösung von 1-Chlor-1-(1-nitrosoethyl)cyclohexan (2,3 g, 13 mmol) in Dichlormethan (30 ml) wurde tropfenweise über 1 h zugegeben. Die Mischung wurde dann bei Raumtemperatur 18 h lang zum Rühren stehengelassen. Das Lösungsmittel wurde dann unter verringertem Druck entfernt. Wasser (30 ml) und Ether (25 ml) wurden dann zum Reaktionsrückstand gegeben. Die wässrige Phase und die organische Phase wurden dann getrennt.

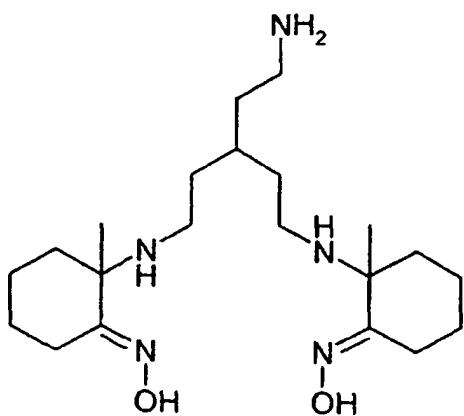
HPLC:

ISOKRATISCH: 90% B (MeOH) 10% (NH₃ 3%). Etherextrakt: HPLC zeigte zwei Hauptbänder – erstes Band: Dioxim, zweites Band: Trioxim. Dioxim: (0,55 g, 20%), FAB m/z 424 (M + H), HRMS: gefunden: 424,3642, berechnet: 424,3652 (C₂₃H₄₅N₅O₂).

NMR:

δ _H (CDCl₃: 270 Hz, 1,34–1,72 (33H, m, CH, CH₂ × 13, CH₃ × 2), 2,18–2,33 (4H, m, NCH₂ × 2), 2,56–2,69 (2H, m, NCH₂).

[0099] Die Verbindung 1-(1-{3-(2-Aminoethyl)-5-[1-(1-hydroxyiminoethyl)cyclohexylamino]pentylamino}cyclohexyl)ethanondioxim [Verbindung 8] wurde auf eine analoge Weise hergestellt:



Verbindung 8

FAB m/z 396 (M + H), HRMS: gefunden: 396,3322, berechnet: 396,3339 ($C_{21}H_{42}N_5O_3$).

Beispiel 10: Vergleichendes ^{99m}Tc -Radiomarkieren der Verbindung 2 versus dem entsprechenden Aza-Analogon (Verbindung 3, Stand der Technik)

[0100] Eine gefriergetrocknete Formulierung, enthaltend:

23 µg Verbindung 2 (das Benzamid-Derivat der Verbindung 1 – s. Beispiel 3),

36 µg Zinnchloriddihydrat,

90 µg Medronat-Trinatrium

4,0 mg Natriumacetat,

versiegelt unter Stickstoffgas (USP/NF) in einem 10 ml-Glasfläschchen wurde hergestellt.

[0101] Dies wurde zur gewünschten Konzentration mit ^{99m}Tc -Pertechnetat in Salzlösung von einem ^{99m}Tc -Generator verdünnt, bei Raumtemperatur, und die RCP durch HPLC und ITLC (Instant Thin Layer Chromatography) studiert. Die Ergebnisse wurden mit jenen der Verbindung 3 verglichen und sind in Tabellen 1 und 2 gezeigt:

Tabelle 1:

ITLC-Ergebnisse radiochemischer Reinheit (%):			
	Verbindung 3 (Stand der Technik)	Verbindung 3 (Stand der Technik)	Verbindung 2
Zeit nach der Ver- dünnung zur gewünschten Konzentration (min)	pH 9	pH 10	pH 9
15	13,2	37,0	96,5
	12,8	36,4	
30	28,4	55,3	96,3
	24,3	53,4	
60	47,8	69,5	97,0
	44,4	71,0	
120	77,4	85,0	
	71,1	82,7	

Tabelle 2: ITLC- und HPLC-Ergebnisse radiochemischer Reinheit für Verbindung 2%

Verbindung 2	
Zeit nach der Verdünnung zur gewünschten Konzentration (min)	pH 9
15 ITLC	95 (5% RHT)
15HPLC	97,7

Wobei

RHT = reduziertes hydrolysiertes Technetium

Beispiel 11: 99m Tc-Markieren der Verbindung 5 - Ein Peptid-Konjugat der Verbindung 1

[0102] Eine gefriergetrocknete Formulierung, enthaltend:

50 µg PABA (para-Aminobenzoësäure),

30 µg SnCl₂,

90 µg MDP (Methylendiphosphonsäure),

1,32 mg NaHCO₃,

98 µg Na₂CO₃,

4 mg NaOAc,

wurde unter Stickstoffgas in einem 10 ml-Glasfläschchen versiegelt. Das Glasfläschchen wurde aus der Gefrier-Lagerung entfernt und bei Raumtemperatur 15 min lang stehengelassen, und wurde dann mit 100 µl einer Lösung, die die Verbindung 5 enthielt, d.h. das Peptidchelatorkonjugat Ac-Asn-Gln-Glu-Gln-Val-Ser-Pro-(I-Tyr)-Thr-Leu-Leu-Lys-Gly-[Verbindung 1] (2 mg in 2 ml Wasser) und 99m Tc-Pertechnetat in Salzlösung mit einer radioaktiven Konzentration von 0,5 GBq/ml, von einem Amertec II 99m Tc-Generator bei Raumtemperatur zur gewünschten Konzentration verdünnt. Die Aktivität wurde unter Verwenden einer Ionenkammer gemessen. Der RCP wurde unter Verwenden von ITLC und HPLC gemessen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 für verschiedene Werte von X gezeigt:

Tabelle 3:

ITLC- und HPLC-Ergebnisse radiochemischer Reinheit für die Verbindung 5 (%):					
Präp.	Volumen X der Verdünnung zur gewünschten Konzentration (ml)	Aktivität (GBq)	Zeit nach der Verdünnung zur gewünschten Konzentration (min)	RCP % (HPLC)	RCP % (ITLC)
1	2	1,04	15		99,4
			255	86,8	99,2
2	2	1	15	83,0	99,3
			60	85,2	
3	5	2,47	15	86,5	99,3
			150	87,6	
4	2	1,02	15		99,1
			140	86,6	

Beispiel 12: In vitro-Gerinnsel-Aufnahme der 99m Tc-markierten Verbindung 5 versus jener der 99m Tc-markierten Verbindung 6 (Stand der Technik)

[0103] Das 99m Tc-Radiomarkieren wurde ausgeführt gemäß Beispiel 10.

[0104] Plasma (5 ml pro Testgegenstand) und Thrombin (100 Einheiten ml^{-1}) wurden aus der Lagerung ($-20^{\circ}C$) entfernt und man ließ sie bei Raumtemperatur auftauen. Plasma wurde vor der Verwendung untersucht, um sicherzustellen, dass es kein Anzeichen einer Gerinnungsbildung oder Proben-Verschlechterung gab.

[0105] 10 μ l 99m Tc-Verbindung 5 oder 99m Tc-Verbindung 6 wurde zu einem 5ml-Glasfläschchen-Plasma (Ratte, Kaninchen, Hund und Mensch) gegeben. 10 μ l 99m Tc-DTPA wurde zu einem zweiten Glasfläschchen gegeben, das 5 ml Plasma enthielt, parallel als eine negative Kontrolle. Die Gerinnung-Bildungs-Inkubationsmischungen wurden durch die Zugabe von 800 μ l Kalzium-Tris-Puffer und 40 μ l-Kalbs-Thrombin-Lösung in vier Glasfläschchen (Kalzium/Thrombin-reiche Gerinnungsbildungspuffer) hergestellt. Nicht-Gerinnungsbildende Inkubation, die Bindungs-Assay-Untergrundsmischungen, wurden durch die Zugabe von 800 μ l Tris-gepufferter Salzlösung zu 40 μ l AnalaR-Wasser (Kalzium/Thrombin-ärmer, nicht-Gerinnungsbildender Puffer) hergestellt.

[0106] 400 μ l menschliches Plasma, das mit dem Testgegenstand (99m Tc-Verbindung 5 oder 99m Tc-Verbindung 6) beimpft war, oder die radiomarkierte negative Kontrolle (99m Tc-DTPA) wurden jeweils in vierfacher Ausführung zu beiden der Kalzium/Thrombinreichen und Kalzium/Thrombin-armen Inkubationsmischungen gegeben. Ein einzelner Defibrinier-Stab wurde zu jedem Glasfläschchen gegeben, um die Plasma-Gerinnungsbildung zu vereinfachen. Die Assay-Glasfläschchen wurden bei Umgebungstemperatur 1 h lang inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 1 ml 0,4 M EDTA-Lösung zu jedem P7-Glasfläschchen beendet.

[0107] Die vorhandene Gesamtradioaktivität wurde (in vierfacher Ausführung) durch Zugeben von 400 μ l-Proben Plasma, das zuvor mit dem Testgegenstand und negativen Kontrollen beimpft war, in individuelle Glas-Scintillations-Fläschchen bestimmt. Die mit diesen Standards in Zusammenhang stehende Radioaktivität wurde durch Natriumiodid-Scintigraphie bestimmt. Die Inhalte jedes P7-Glasfläschchens wurden auf individuelle BSA-blockierte Nitrocellulosefilter über einem Vakuumverteiler dekantiert. Jedes P7-Glasfläschchen wurde mit 2 ml TBST-Lösung gespült. Jeder Filter wurde dann mit vier 5 ml-Spülungen der TBST-Lösung gespült. Die Gerinnsel wurden 1 h lang über dem Vakuumverteiler getrocknet. Die Filterpapiere wurden dann in individuelle Scintillations-Glasfläschchen übertragen und die vorhandene Radioaktivität wurde bestimmt.

[0108] Nicht-spezifisches Binden des Testgegenstands an das Nitrocellulosefilter wurde durch Subtrahieren der in der Gerinnung-Bildungs-Mischung vorhandenen Gesamtradioaktivität von der Gesamtradioaktivität, die in der nicht-Gerinnungsbildenden Mischung vorhanden war, ausgeklammert. Die Aufnahme in das Gerinnel allein (spezifisch und nicht-spezifisch) wurde als die prozentuale Aufnahme des Testgegenstands in das Plasma ausgedrückt durch Dividieren der in dem Gerinnel allein vorhandenen Radioaktivität durch die durchschnittliche Radioaktivität, die in dem Plasmastandards vorhanden war, und dann Multiplizieren mit 100:

% Aufnahme = % Aufnahme in ein Gerinnel, auf einem Filter - % Aufnahme auf Filter x 100

(Untergrund korrigiert)

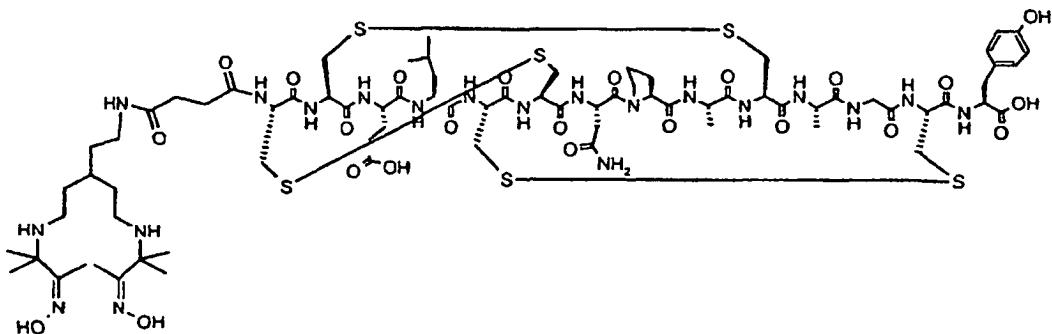
[0109] Die prozentuale spezifische Bindung wurde als die radioaktive Aufnahme bestimmt, die nur auf den aufgrund des Faktors VIIIa gebildeten kovalenten Isopeptid-Bindungen zwischen Fibrin und dem Testgegenstand beruhte. Die spezifische Bindung wurde durch Subtrahieren der Untergrund(Nitrocellulosefilter)-korrigierten prozentualen Aufnahme der radiomarkierten negativen Kontrolle (99m Tc-DTPA), die keine Affinität für FXIIIa besaß, von der Untergrund(Nitrocellulosefilter)-korrigierten prozentualen Aufnahme des radiomarkierten Testgegenstandes berechnet:

Spezifische Bindung des Testgegenstands = % Aufnahme Testgegenstand - % Aufnahme DTPA
(an das Gerinnel) (in das Gerinnel) (in das Gerinnel)

Effekte auf die in vitro-Wirksamkeit

[0110] Die Daten verglichen die Aufnahme der 99m Tc-Verbindung 5 und 99m Tc-Verbindung 6 in ein sich bildendes Plasma-Gerinnel in vitro. Es gab keinen signifikanten Unterschied ($p > 0,05$) in der Wirksamkeit dieser zwei Moleküle ($30,66 \pm 5,01$ verglichen mit $29,69 \pm 6,33$) in diesem Modell der Koagulation.

Beispiel 13: ^{99m}Tc -Markieren der Verbindung 9



Verbindung 9

[0111] Verbindung 9 ist das Konjugat der Verbindung 1 mit dem gezeigten cyclischen Peptid, d.h. [Verbindung 1]-Cys-Cys-Glu-Leu-Cys-Cys-Asn-Pro-Ala-Cys-Ala-Cys-Tyr-OH.

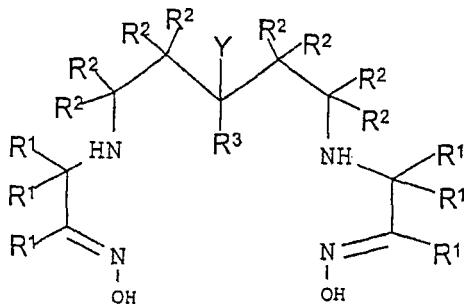
[0112] Verbindung 9 wurde in einer zu den Beispielen 7 und 8 analogen Weise hergestellt und mit ^{99m}Tc in Lösung (Präparat 1) oder über ein gefriergetrocknetes Kit gemäß Beispiel 10 (Präparat 2) markiert.

[0113] Für das Präparat 1 wurden 100 µg der Verbindung 9 in 1 ml eines pH 8,5-Boratpuffers aufgelöst. Dies wurde in ein P6-Glasfläschchen übertragen und versiegelt. 1 ml 99m Tc-Pertechnetat in Salzlösung (1,0 GBq/ml von einem Amertec II-Generator) wurde bei Raumtemperatur zugegeben, zusammen mit 0,1 ml SnCl_2 -Lösung (10 mg SnCl_2 in 100 ml N_2 -gespülter Salzlösung). Die Aktivität wurde unter Verwenden einer Ionenkammer gemessen. Der RCP wurde unter Verwenden von ITLC und HPLC gemessen.

[0114] Das Präparat 1 zeigte einen RCP von 96% durch ITLC und das Präparat 2 einen RCP von 82% durch HPLC.

Patentansprüche

1. Chelatorkonjugat der Formel:



wobei:

jedes R^1 , R^2 und R^3 unabhängig für eine R-Gruppe steht;

Y für $-(A)_n-X-Z$ steht,

wobei:

X für $-\text{NR}^4-$, $-\text{CO}_2-$, $-\text{N}(\text{C}=\text{S})-$, $-\text{N}(\text{C}=\text{O})-$, $-\text{S}-$ oder $-\text{O}-$ steht;

Z für eine biologische Targetingseinheit steht, was 3-100-mer-Peptide oder -Peptidanaloga, die lineare Peptide oder cyclische Peptide oder Kombinationen davon sein können; monoklonale Antikörper oder Fragmente davon; oder Enzymsubstrate oder Inhibitoren; synthetische rezeptorbindende Verbindungen; Oligonukleotide oder Oligo-DNA- oder Oligo-RNA-Fragmente, bedeutet;

R^4 unabhängig für eine R-Gruppe steht;

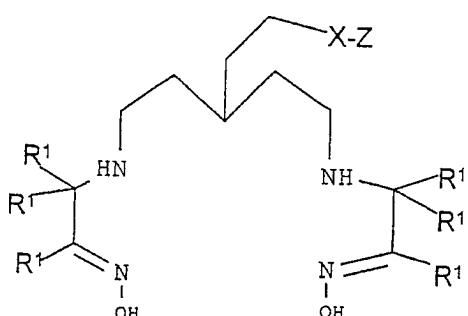
-(A)_n für eine Linkergruppe steht, bei der jedes A unabhängig sieht für -CR₂-, -CR=CR-, -C≡C-, -NRCO-, -CONR-, -SO₂NR-, -NRSO₂-, -CR₂OCR₂-, -CR₂SCR₂-, -CR₂NRCR₂-, eine C₄₋₈-Cycloheteroalkylengruppe, eine C₄₋₈-Cycloalkylengruppe, eine C₅₋₁₂-Arylengruppe, eine C₃₋₁₂-Heteroaryliengruppe oder eine Polyalkylenglycol-, Polymilchsäure- oder Polyglycolsäureeinheit:

Um eine ganze Zahl des Wertes 0 bis 10 ist:

jede R-Gruppe unabhängig steht für N oder C_{1-10} -Alkyl, C_{3-10} -Alkylaryl, C_{3-10} -Alkoxyalkyl, C_{1-10} -Nhydroxyalkyl.

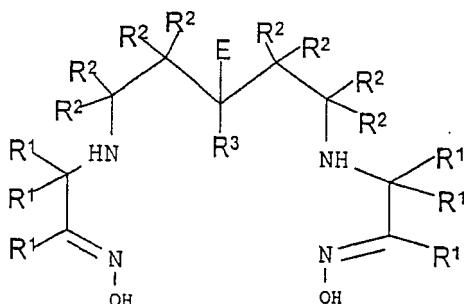
C_{1-10} -Fluoralkyl, oder zwei oder mehr R-Gruppen, zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen carbocyclischen, heterocyclischen, gesättigten oder ungesättigten Ring bilden.

2. Chelatorkonjugat des Anspruchs 1, wobei R^3 für H steht.
3. Chelatorkonjugat der Ansprüche 1 und 2, wobei jedes R^2 für H steht.
4. Chelatorkonjugat der Ansprüche 1 bis 3, wobei X für $-NR^4-$ oder $-CO_2-$ steht.
5. Chelatorkonjugat der Ansprüche 1 bis 4, wobei $-(A)_n-$ eine Grundgerüstkette von zwei bis zehn Atomen umfasst.
6. Chelatorkonjugat der Ansprüche 1 bis 5, wobei Y für $-CH_2CH_2-X-Z$ steht.
7. Chelatorkonjugat der Ansprüche 1 bis 6, wobei R^1 für C_{1-13} -Alkyi, C_{2-4} -Alkoxyalkyl, C_{1-3} -Hydroxyalkyl oder C_{1-3} -Fluoralkyl steht.
8. Chelatorkonjugat der Ansprüche 1 bis 7, der Formel:



wobei jedes R^1 unabhängig für C_{1-3} -Alkyl oder C_{1-3} -Fluoralkyl steht.

9. Chelatorkonjugat des Anspruchs 8, wobei sämtliche R^1 -Gruppen für CH_3 stehen.
10. Chelatorkonjugat der Ansprüche 1 bis 9, wobei Z für ein 3-20-mer-Peptid steht.
11. Radiometallkomplex des Chelatorkonjugats der Ansprüche 1 bis 10.
12. Radiometallkomplex des Anspruches 11, wobei der Radiometallkomplex elektrisch neutral ist.
13. Radiometallkomplex der Ansprüche 11 und 12, wobei das Radiometall ^{99m}Tc ist.
14. Radiopharmazeutikum, das den Radiometallkomplex der Ansprüche 11 bis 13 umfasst, in einer für die Verabreichung an den Menschen geeigneten Form.
15. Radiopharmazeutikum des Anspruchs 14, wobei das Radiometall ^{99m}Tc ist.
16. Kit für die Herstellung des ^{99m}Tc -Radiopharmazeutikums des Anspruchs 15, umfassend:
 - (i) das Chelatorkonjugat der Ansprüche 1 bis 10;
 - (ii) ein biokompatibles Reduktionsmittel.
17. Kit des Anspruchs 16, wobei das biokompatible Reduktionsmittel zinnhaltig ist.
18. Verbindung der Formel:



wobei:

jedes R¹, R² und R³ unabhängig für eine R-Gruppe steht;

E für -(A)_n-J steht;

wobei:

J für eine funktionelle Gruppe steht, die zur Konjugation an Z geeignet ist;

-(A)_n- für eine Linkergruppe steht, wobei jedes A unabhängig steht für -CR₂-, -CR=CR-, -C≡C-, -NRCO-, -CONR-, -SO₂NR-, -NRSO₂-, -CR₂OCR₂-, -CR₂SCR₂-, -CR₂NRCR₂-, eine C₄₋₈-Cycloheteroalkylengruppe, eine C₄₋₈-Cycloalkylengruppe, eine C₅₋₁₂-Arylengruppe, eine C₃₋₁₂-Heteroarylengruppe oder eine Polyalkylenglycol-, Polymilchsäure- oder Polyglycolsäureeinheit;

n für eine ganze Zahl des Wertes 0 bis 10 steht;

jede R-Gruppe unabhängig steht für H oder C₁₋₁₀-Alkyl, C₃₋₁₀-Alkylaryl, C₂₋₁₀-Alkoxyalkyl, C₁₋₁₀-Hydroxyalkyl, C₁₋₁₀-Fluoralkyl, oder zwei oder mehr R-Gruppen, zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen carbocyclischen, heterocyclischen, gesättigten oder ungesättigten Ring bilden.

19. Verbindung des Anspruchs 18, wobei J für -NR⁵R⁶, -CO₂M, -NCS, -NCO, -SM¹, -OM¹, Maleimid oder Acrylamid steht,

wobei

R⁵ und R⁶ unabhängig für eine R-Gruppe oder P^G steht;

M für H, ein Kation, P^G oder einen aktiven Ester steht;

M¹ für H oder P^G steht; und

P^G für eine Schutzgruppe steht.

20. Verbindung der Ansprüche 18 oder 19, wobei R³ für H steht.

21. Verbindung der Ansprüche 18 bis 20, wobei jedes R² für H steht.

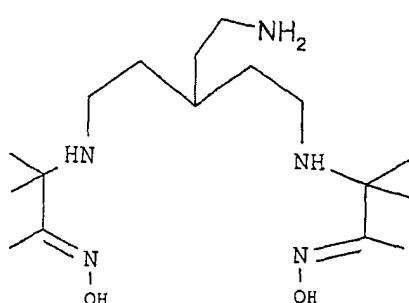
22. Verbindung der Ansprüche 18 bis 21, wobei R¹ für C₁₋₃-Alkyl, C₂₋₄-Alkoxyalkyl, C₁₋₃-Hydroxyalkyl oder C₁₋₃-Fluoraikyl steht.

23. Verbindung der Ansprüche 18 bis 22, wobei -(A)_n- eine Grundgerüstkette von zwei bis zehn Atomen umfasst.

24. Verbindung der Ansprüche 18 bis 23, wobei E für -CH₂CH₂-J steht.

25. Verbindung des Anspruchs 24, wobei J für -NHR⁵ steht und R⁵ für H oder C₁₋₃-Alkyl steht.

26. Verbindung:

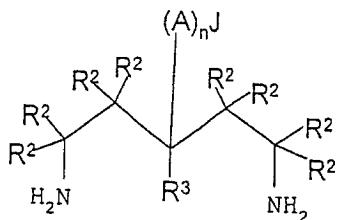


27. Verbindung der Formel: HC(CH₂CH₂NR⁷R⁸)₃, wobei R⁷ und R⁸ unabhängig für H oder P^G stehen, oder R⁷ und R⁸ zusammen P^G bilden;

wobei P^G für eine Schutzgruppe steht;
oder ein Salz davon.

28. Verbindung $HC(CH_2CH_2NH_2)_3$.

29. Verfahren zur Herstellung der Verbindung des Anspruchs 18, umfassend eine Alkylierung einer Verbindung der Formel IV:



Formel IV

mit entweder:

- (i) einer Chlornitroso-Verbindung der Formel $Cl-C(R^1)_2-CH(NO)R^1$; oder
 - (ii) einem alpha-Chloroxim der Formel $Cl-C(R^1)_2-C(=NOH)R^1$; oder
 - (iii) einem alpha-Bromketon der Formel $Br-C(R^1)_2-C(=O)R^1$ gefolgt von einer Umwandlung des Diamindiketon-Produkts zum Diamindioxim mit Hydroxylamin;
- wobei A, J, R¹, R², R³ und n wie in Anspruch 18 definiert sind.

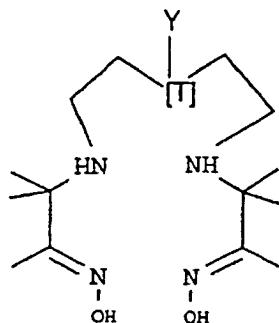
30. Verfahren zur Herstellung der Verbindung des Anspruchs 26, umfassend eine Alkylierung von $HC(CH_2CH_2NH_2)_3$, mit entweder:

- (i) einem Chlornitroso-Derivat der Formel $Cl-C(CH_3)_2-CH(NO)CH_3$; oder
- (ii) einem alpha-Chloroxim der Formel $Cl-C(CH_3)_2-C(=NOH)CH_3$; oder
- (iii) einem alpha-Bromketon der Formel $Br-C(CH_3)_2-C(=O)CH_3$, gefolgt von einer Umwandlung des Diamindiketon-Produkts zum Diamindioxim mit Hydroxylamin.

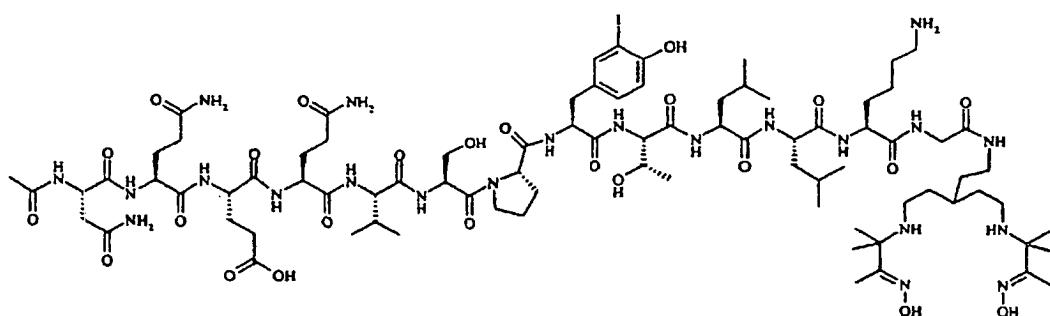
Es folgen 3 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

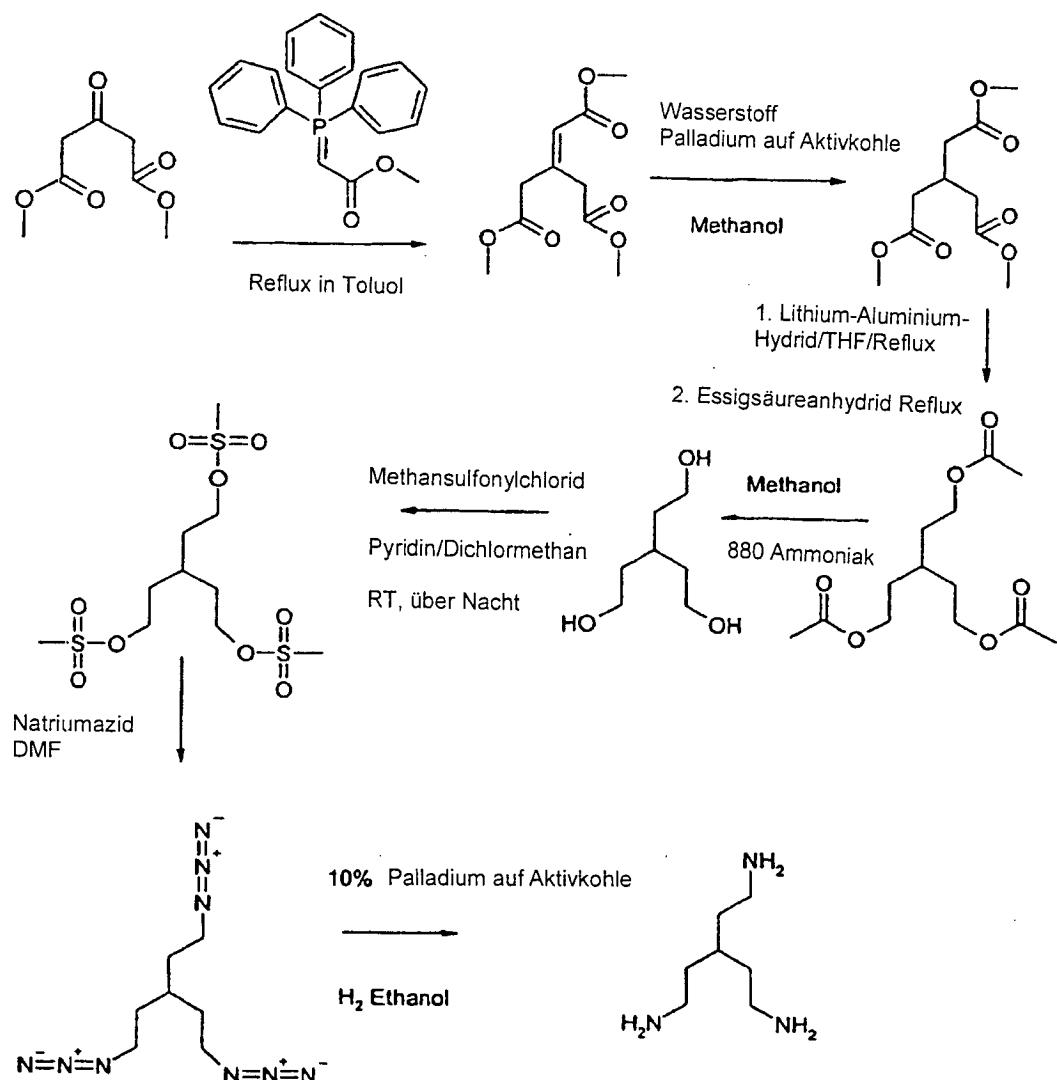
Figur 1: Chemische Strukturen der Verbindungen 1 bis 6



Verbindung	T	Y
1	CH	-CH ₂ CH ₂ NH ₂
2	CH	-CH ₂ CH ₂ NH(CO)C ₆ H ₅
3	N	-CH ₂ CH ₂ NH(CO)C ₆ H ₅
4	CH	-CH ₂ CH ₂ NH(CO)(CH ₂) ₃ CO ₂ H
5	CH	-GKLLT(3-I)YPSVQEQN-Ac
6	N	-GKLLT(3-I)YPSVQEQN-Ac

Figur 2: Chemische Struktur der Verbindung 5 – Das Peptid-Chelator-Konjugat
Ac-Asn-Gln-Glu-Gln-Val-Ser-Pro-(I-Tyr)-Thr-Leu-Leu-Lys-Gly- [Verbindung 1].

Figur 3: Azid-Route zu 1,1,1-Tris(2-aminoethyl)methan



Figur 4: Alternative Synthese von 1,1,1-Tris(2-aminoethyl)methan

