



(12) PATENT

(11) 343348

(13) B1

NORGE

(19) NO

(51) Int Cl.

A61K 47/50 (2017.01)

A61K 49/00 (2006.01)

A61K 51/04 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20091379	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2007.07.02 PCT/US2007/72669
(22)	Inng.dag	2009.04.03	(85)	Videreføringsdag	2009.04.03
(24)	Løpedag	2007.07.02	(30)	Prioritet	2006.10.05, US, 60/828,347 2007.06.28, US, 11/770,395
(41)	Alm.tilgj	2009.04.21			
(45)	Meddelt	2019.02.04			
(73)	Innehaver	The Board of Regents of the University of Texas System, 201 West 7th Street, TX78701 AUSTIN, USA Cell>Point LLC, 7120 E. Orchard Road, Suite 350, CO80111 CENTENNIAL, USA			
(72)	Oppfinner	David J Yang, 1123 Spinnaker Way, TX77030 SUGAR LAND, USA Dongfang Yu, 15002 Beechurst Drive, TX77030 HOUSTON, USA Andrew S Thompson, 1144 Sawmill Road, NJ07092 MOUNTAINSIDE, USA F David Rollo, 15735 Peach Hill Road, CA95070 SARATOGA, USA			
(74)	Fullmektig	BRYN AARFLOT AS, Stortingsgata 8, 0161 OSLO, Norge			

(54)	Benevnelse	Syntese av chelatorer og slike forbindelser for nukleær bildebehandling og diagnose			
(56)	Anførte publikasjoner	US 2005079133 A1, US 2006182687 A1, VERBEKE K ET AL, "DEVELOPMENT OF A CONJUGATE OF 99MTC-EC WITH AMINOMETHYLENEDIPHOSPHON ATE IN THE SEARCH FOR A BONE TRACER WITH FAST CLEARANCE FROM SOFT TISSUE", BIOCONJUGATE CHEMISTRY, ACS, WASHINGTON, DC, US, (20011227), vol. 13, no. 1, ISSN 1043-1802, pages 16 - 22, David Yang et al.: "Assessment of Therapeutic Tumor Response Using 99m Tc-Ethylenedicysteine-Glucosamine", Box TX Tel CANCER BIOTHERAPY & RADIOPHARMACEUTICALS, 1 January 2004, side 713-794			
(57)	Sammendrag				

Nye metoder for syntese av chelator-målsøkende ligandkonjugater, preparater omfattende slike konjugater og terapeutiske og diagnostiske applikasjoner av slike konjugater er beskrevet. Preparatene omfatter chelator-målsøkende ligandkonjugater eventuelt chelatert til én eller flere metallioner. Metoder for syntetisering av disse preparater med høy renhet er også presentert. Også beskrevet er metoder for avbildning, behandling av og diagnostisering av sykdom i et individ ved anvendelse av disse nye preparater, så som metoder for avbildning en tumor i et individ og metoder for diagnostisering av myokardial ischemi.

BESKRIVELSE

BAKGRUNN FOR OPPFINNELSEN

1. Oppfinnelsens område

Foreliggende oppfinnelse angår generelt kjemisk syntese, samt anvendelser av forbindelsene i fremgangsmåter ved avbildning, radioterapi, merking, kjemoterapi, medisinsk terapi, behandling av kardiovaskulære sykdomer og behandling av kreft. Mer spesielt angår oppfinnelsen nye metoder for syntese av chelator-målsøkende ligandkonjugater. Organiske metoder for syntese er angitt her som gir utbytte av chelator-målsøkende ligander med høy renhet sammenlignet med chelator-målsøkende konjugater fremstilt ved vandige metoder. Metoder for avbildning av et område ved anvendelse av disse konjugater, så vel som sett for fremstilling av disse konjugater, er også angitt her. Metoder for diagnose og behandling av sykdommer (*i.e.*, kreft, kardiovaskulære sykdommer, infeksjoner og inflammasjon) i et individ ved anvendelse av preparater som omfatter ovennevnte konjugater er også beskrevet.

2. Beskrivelse av kjent teknikk

Biomedisinsk avbildning omfatter forskjellige modaliteter som er utstrakt anvendt av leger og forskere for å bidra til ikke bare diagnose av en sykdom i et individ, men også til å få en større forståelse av normale strukturer og funksjoner i kroppen. Eksempler på avbildningsmodaliteter omfatter PET, SPECT, gamma-kamera avbildning, CT, MRI, ultralyd, dobbelt ("dual") avbildning og optisk avbildning.

I mange tilfeller krever optimal avbildning av et særskilt område hos et individ administrering av et spesielt middel til individet. Uorganiske metaller så som technesium (^{99m}Tc), jern, gadolinium, rhenium, mangan, kobolt, indium, platina, kobber, gallium eller rhodium har vist seg å være verdifulle komponenter i mange avbildningsmidler.

Merking av molekyler med uorganiske metaller kan oppnås ved å chelatere metallet til kombinasjoner av oksygen, svovel og nitrogenatomer, for eksempel i spesifikke forbindelser. Chelatorer så som kolloidalt svovel, dietyltriampentaeaddisyre (DTPA, O_4), etylendiaminetetraeaddisyre (EDTA, O_4) og 1,4,7,10-tetraazacyklododecan- N,N',N'',N'''' -tetraeaddisyre (DOTA, N_4) har vært anvendt for dette formål. Imidlertid har

uorganiske metaller som er chelatert på denne måten begrenset anvendelighet for avbildning på grunn av deres raske utskillelse fra kroppen.

Den foretrukne radioaktive merking for avbildningsmidler er technesium (^{99m}Tc) på grunn av dens fordelaktige halveringstid (6 timer), enkel produksjon, lett tilgjengelighet, lav energi (140 keV) og lave kostnader. Den lengre halveringstiden til isotoper som ^{99m}Tc gjør transporten av de radiomerkede aminosyrene til sykehus uten on-site syklotron eller dedikerte radiokjemilaboratorier enklere. Imidlertid er ofte kobling av ^{99m}Tc til medikamenter for avbildningsformål en utfordring.

^{188}Re har gode karakteristika for avbildning og for potensiell terapeutisk anvendelse på grunn av dens høye β energi (2,1 MeV), kort fysisk halveringstid (16,9 timer) og 155 keV gamma-stråle emisjon for dosimetriske- og avbildningsformål. Den korte fysiske halveringstiden til ^{188}Re tillater høyere doser sammenlignet med lang-livede radionuklider. Videre reduserer den korte halveringstiden problemene knyttet til håndtering av radioaktivt avfall og lagring. Spesielt er ^{188}Re tilgjengelig fra et internt generatorsystem på samme måte som en ^{99m}Tc generator. ^{188}Re kan oppnås fra en $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ generator, som gjør den meget hensiktsmessig for klinisk anvendelse. Både ^{99m}Tc og ^{188}Re avgir gammastråler, slik at dosimetrien basert på ^{99m}Tc bilder er forventet å være mer nøyaktig enn for tilsvarende produsert ved anvendelse av den normale standard radioisotopen, Y-90.

Angående avbildning ved anvendelse av positron emisjonstomografi (PET) må PET radiosyntese være rask fordi radioisotopene vil dekomponere under langvarig kjemisk syntese og høyere risiko for strålingseksponering kan forekomme under radiosyntesen. Syklotron-baserte tracere er begrenset av tilgjengeligheten av en lokal syklotron og dens høye kostnader. The Food and Drug Administration (FDA) tillater radiofarmasøytisk produksjon i sentrale kommersielle anlegg under godt kontrollerte betingelser og distribusjon til lokale sykehus hvor de blir administrert. Tilsvarende er radionuklid generatorsystemer som kan produsere i et godt kontrollert anlegg omfattet av gjeldene FDA-prosedyrer og har en lang historie med vellykkede kliniske anvendelser. En generator anvender et foreldre-datter ("parent-daughter") nuclidpar hvor en relativt langtlevende foreldre-isotop dekomponerer til en kortlevende datter-isotop som anvendes for avbildning. Foreldre-isotopen, som blir produsert ved et syklotronanlegg, kan fraktes til en klinikk hvor datter-isotopen kan elueres på stedet for klinisk anvendelse.

⁶⁸Ga har en høy positronemitterende mengde (89% av dens total dekomponering) og derfor er hovedbetraktningen ved dette radionuklidet, dens romlige spaltning som avhenger av positronområde (energien), ikke-kolineæriteten til ødeleggende fotoner, indre egenskaper, størrelse og geometrien til detektoren og valg av rekonstruksjonsalgoritmen. Aspekter ved detektordesign, fysikalske egenskaper og deres påvirkning på systemets romlige spaltning er i stor utstrekning omtalt av mange forfattere, hvilket fører til en kontinuerlig optimalisering av utstyret. Selv om maksimal positronenergi for ⁶⁸Ga (maks = 1,90 MeV, gjennomsnitt = 0,89 MeV) er høyere enn for ¹⁸F (maks = 0,63 MeV, gjennomsnitt = 0,25 MeV) viste en undersøkelse ved anvendelse av Monte Carlo analyse for romlig spaltning, at under antagelsen av 3 mm romlig oppløsning av PET detektorer, er den konvensjonelle fulle bredde ved halvparten av maksimum (FWHM) til ¹⁸F og ⁶⁸Ga ikke til å skjelne i mykt vev (3,01 mm vs. 3,09 mm). Det medfører at med en romlig oppløsning på 5 til 7 mm i vanlige kliniske scannere kan avbildningskvaliteten ved anvendelse av ⁶⁸Ga-baserte tracere være like god som for ¹⁸F-baserte midler og dette har stimulert andre til å undersøke potensielle ⁶⁸Ga-baserte avbildningsmidler. Videre har ⁶⁸Ga-baserte PET-midler et betydelig kommersielt potensiale fordi isotopen kan produseres ved hjelp av en ⁶⁸Ge generator (275-dagers halveringstid) på stedet og tjene som et hensiktsmessig alternativ til cyklotron-basert PET isotoper, så som ¹⁸F eller ¹³N.

Angående syntetisk fremstilling av avbildningsmidler, når slike midler blir fremstilt i vandige (våte) betingelser, kan rensning av midlene noen ganger være et problem. Rensning under vandige betingelser kan oppnås ved anvendelse av, for eksempel størrelsesekskluderingskromatografi eller dialyse med membraner med spesielle molekylvektskutt; for eksempel er dialyse typisk mest effektiv når separasjonskandidatene har molekylvekter på 1000 g/mol eller høyere. Imidlertid isolerer denne metoden ikke bare de ønskede midler, men også hvilke som helst andre specier som kan passerer gjennom membranet. Innføring av urenheter til avbildningsmidler kan være problematisk i fremtidige applikasjoner for avbildningsmidler, spesielt ved avbildning og/eller terapeutiske anvendelser. For eksempel, hvis et avbildningsmiddel som omfatter et radionuklid (det "egentlige" avbildningsmiddel) er antatt å være rent, men faktisk inneholder urenheter som også omfatter et radionuklid kan målingene eller deteksjonen av det "egentlige" avbildningsmiddel være tildekket ("obscured") eller bli feilaktig på grunn av tilstedeværelse av urenheter.

Metoder for syntese av organiske forbindelser i organiske media, som ved anvendelse av organiske løsningsmidler og anvendelse av beskyttelsesgrupper, gir typisk forbedringer i rensingen av forbindelser sammenlignet med vandig rensning. Bruk av beskyttelsesgrupper tillater ulike funksjonelle grupper som mellomprodukter under syntesen å være beskyttet og letter rensingen av mellomproduktene. Forskjellige metoder for rensning ved anvendelse av organiske løsningsmidler tillate separasjon og isolering av ønskede forbindelser, så som avbildningsmidler med meget liten urenhet. Videre kan specier med molekylvekter under 1000 g/mol ofte lett renses ved anvendelse av organisk-kjemiske rensemetoder. I betraktning av fordelene gjennom organisk syntese og rensning sammenlignet med vandig rensning, vil metoder for organisk syntese og rensning av avbildningsmidler gi midler med høyere renhet enn de oppnådd via vandig rensning.

Hittil er visse avbildningsmidler kun fremstilt via vandige metoder. Urenhetene til stede i disse midlene kan ekskludere disse fra anvendelse av som avbildnings- og/eller terapeutiske midler. Således eksisterer et behov for fremstilling av disse og andre midler ved anvendelse av syntetiske organiske teknikker for å gi midler med høyere renhet.

US2005/079133 A1 beskriver ethylendicystein (EC)-medikamentkonjugater, blandinger og metoder for vevsspesifikk sykdomsavbildning.

US 2006/182687 A1 beskriver konjugater for dobbelt-avbildning og radiokjemoterapi: blandinger, fremstilling og anvendelser.

VERBEKE K ET AL, beskriver utvikling av et konjugat av ^{99m}Tc -EC med aminometylendifosfonat i søken etter en ben-tracer med rask frigivelse fra mykvev.

David Yang et al. beskriver evaluering av terapeutisk tumorrespons ved anvendelse av ^{99m}Tc -etylendicysteinglukosamin.

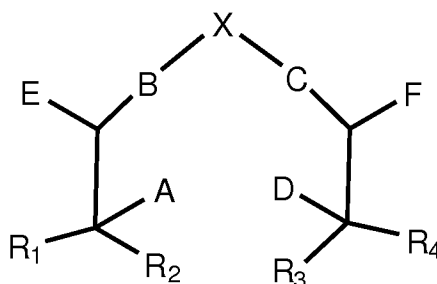
25

OPPSUMMERING AV OPPFINNELSEN

Foreliggende oppfinnere har identifisert nye metoder for syntese av midler som er, i visse utførelsesformer, konjugater av en chelator og et målsøkende ligand (også betegnet en målsøkende gruppe). Slike midler kan for eksempel anvendes for avbildning, diagnose og/eller terapeutiske formål. Både organiske (løsningsmiddelbasert) og våt (vandig) syntese og rensemetoder er beskrevet og det er vist at organisk syntese og rensemetoder resulter i forbindelser med høyere renhet enn de fremstilt/renset ved våt kjemi. Forbindelser med høy renhet er for eksempel bedre kandidater for kliniske applikasjoner.

Videre gir visse forbindelser og metoder ifølge foreliggende oppfinnelse god fleksibilitet og selektivitet når det gjelder (1) tilgjengelige steder for konjugering av en chelator til en målsøkende ligand og (2) atomer tilgjengelig for chelatering til et metallion.

5 Følgelig, ett generelt aspekt av foreliggende oppfinnelse tilveibringer en metode for syntese av et chelator-målsøkende ligandkonjugat omfattende:



til minst ett målsøkende ligand omfattende minst én funksjonell gruppe, hvor chelatoren er etylendicystein (EC), og hvor de to tiolgruppene og de to aminogruppene av etylendicystein er beskyttet; dvs. hvor:

- 10
- A og D er hver et beskyttet tiol;
 - B og C er hver et tertiært amin;
 - E og F er hver -COOH;
 - R₁, R₂, R₃ og R₄ er hver H;
 - X er -CH₂-CH₂-; og
- 15
- konjugeringen er mellom A, D, E eller F av chelatoren og minst én ubeskyttet funksjonell gruppe av hver målligand;
 - minst én av A, D og målliganden omfatter en beskyttet funksjonell gruppe,
 - minst én funksjonell gruppe av målliganden er ubeskyttet,
 - målliganden er et middel som etterligner glukose.
- 20
- Konjugater kan omfatte én målsøkende ligand eller flere enn én målsøkende ligand. I noen utførelsesformer omfatter konjugatet to målsøkende ligander. De målsøkende ligander kan være identisk eller kan være forskjellige. Typer av målsøkende ligander er beskrevet mer detaljert nedenfor.

25 Metoder beskrevet her er forskjellige fra metodene beskrevet i samtidige U.S. Søknad Serie nr. 11/737,694, innlevert 19. april, 2007 og er forskjellig fra metodene beskrevet i samtidige Internasjonale Søknad nr. PCT/US2006/016784, innlevert 4. mai, 2006.

Generelt utføres metodene ifølge foreliggende oppfinnelse i et organisk medium. Som anvendt her angir "organisk medium" løsninger og rensemetoder omfattende ett eller flere organiske løsningsmidler. Løsningsmiddelvalgene for metodene ifølge foreliggende oppfinnelse vil være kjent for en fagmann på området. Løsningsmiddelvalget kan avhenge av, for eksempel et som letter oppløsning av alle reagensene, eller for eksempel et som letter de ønskede reaksjoner (spesielt hvis mekanismen til reaksjonen er kjent). Løsningsmidler kan for eksempel omfatte polare løsningsmidler og/eller ikke-polare løsningsmidler. Et løsningsmiddel kan være et polart aprotisk løsningsmiddel, så som dimetylsulfoksid. Løsningsmiddelvalgene omfatter, men er ikke begrenset til, dimetylformamid, dimetylsulfoksid, dioksan, metanol, etanol, heksan, metylenklorid, tetrahydrofuran og/eller acetonitril. I noen utførelsesformer omfatter løsningsmidlene etanol, dimetylformamid og/eller dioksan. Mer enn ett løsningsmiddel kan velges for hvilken som helst spesiell reaksjon eller renseprosedyre. Vann kan også blandes inn i hvilket som helst løsningsmiddelvalg; dette kan for eksempel utføres for å forbedre oppløseligheten av én eller flere reaktanter.

I noen utførelsesformer utføres kun konjugasjonen mellom en chelator og et målsøkende ligand via organisk syntese (dvs., i organisk medium). I noen utførelsesformer utføres kun syntesen av en chelator via organisk syntese. I noen utførelsesformer utføres kun chelatering av et valent metallion via organisk syntese. I visse utførelsesformer kan hvilket som helst ett eller flere av disse trinn finne sted via organisk syntese.

Hvilken som helst chelator (dvs., en forbindelse som kan chelatere eller binde, ett eller flere metallioner) kjent for fagfolk på området kan anvendes ved anvendelse av metodologien ifølge foreliggende oppfinnelse og eksempler på chelatorer er beskrevet mer detaljert her. Chelatorer binder typisk til ett eller flere metallioner via en ionisk binding. I noen utførelsesformer omfatter chelatoren DTPA (dietyltri-aminopentaeddiksyre), én eller flere aminosyrer eller hvilken som helst kombinasjon av én eller flere av disse grupper. I visse utførelsesformer er én eller flere aminosyrer valgt fra gruppen bestående av glycin og cystein. I noen utførelsesformer er chelatoren valgt fra gruppen bestående av dicystein, triglycin cystein og tricystein glycin. Antallet og valget av aminosyrer kan være begrenset av deres oppløselighet i organisk medium. I visse utførelsesformer er chelatoren etylendicystein (EC).

Målsøkende ligander er også beskrevet mer detaljert her. Mens en chelator kan være konjugert (dvs., kjemisk tilknyttet eller bundet) til en målsøkende ligand via hvilken som helst modus kjent for fagfolk på området (e.g., en kovalent binding, en ionisk binding, en dativ binding, et ionepar) omfatter typisk bindingen en kovalent binding.

5 Metoder ifølge foreliggende oppfinnelse kan videre omfatte minst ett rensetrinn. Hvilken som helst forbindelse kan renses via hvilken som helst metode kjent for fagfolk på området. Fagpersoner på området er fortrolig med slike metoder og når de kan anvendes. For eksempel, i en multi-trinns syntese som er rettet mot en spesiell forbindelse kan et rensetrinn utføres etter hvert syntesetrinn, etter noen få trinn, på ulike trinn under syntesen
10 og/eller ved slutten av syntesen. I noen metoder omfatter ett eller flere rensetrinn teknikker valgt fra gruppen bestående av silikagel kolonnekromatografi, HPLC (høy-ytelse væskechromatografi) og LC (væskechromatografi). I visse utførelsesformer utelukkes spesifikt rensemetoder som størrelseseksklusjonskromatografi og/eller dialyse. Metoder for rensning er beskrevet mer detaljert nedenfor.

15 I visse utførelsesformer er unkonjugerte chelatorer og/eller chelator-målsøkende ligandkonjugater dannet via syntetiske organiske metoder i meget høy renhet i forhold til slike forbindelser dannet via vandig metodikk. For eksempel, i noen utførelsesformer av foreliggende oppfinnelse, dannes en unkonjugert chelator, en ubeskyttet chelator, en beskyttet chelator, et chelator-målsøkende ligandkonjugat eller et metallion-merket
20 chelator-målsøkende ligandkonjugat via organiske metoder (eller hvilken som helst forbindelse omfattende en kombinasjon av chelator, beskyttelsesgruppe, målsøkende ligand og metallion) som er mellom ca. 90% og ca. 99,9% rent, sammenlignet med mellom ca. 50% og ca. 70% rent for det vandige produktet. I visse utførelsesformer dannes en unkonjugert chelator, en ubeskyttet chelator, en beskyttet chelator, et chelator-målsøkende
25 ligandkonjugat eller et metallion-merket chelator-målsøkende ligandkonjugat via organiske metoder (eller hvilken som helst forbindelse omfattende en kombinasjon av chelator, beskyttelsesgruppe, målsøkende ligand og metallion) som er omtrent eller minst ca. 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%,
30 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9% rent eller høyere eller hvilket som helst område avledet derav. I visse utførelsesformer er området ca. 70% til ca. 99,9%. I visse utførelsesformer, er området ca. 75% til ca. 99,9%. I visse utførelsesformer

er området ca. 80% til ca. 99,9%. I visse utførelsesformer er området ca. 85% til ca. 99,9%. I visse utførelsesformer er området ca. 90% til ca. 99,9%. I visse utførelsesformer er området ca. 95% til ca. 99,9%.

Funksjonelle grupper, som beskrevet her, kan være av hvilken som helst type kjent for en fagmann på området. Betegnelsen “funksjonell gruppe” angir generelt hvorledes fagpersoner på området klassifiserer kjemisk reaktive grupper. Eksempler omfatter alken, alkyn, aryl (*e.g.*, fenyl, pyridinyl), alkohol, aldehyd, keton, azid, halogen, ester, -COOH, -NH₂, tiol, et sekundært amin, et tertiært amin, -S-, -S(O)- og -S(O)₂-. I noen utførelsesformer omfatter minst én funksjonell gruppe et atom valgt fra gruppen bestående av C, H, O, N, P og S. Stillingene A, B, C, D, E og/eller F kan omfatte én eller flere funksjonelle grupper (*e.g.*, -COOH, -NH₂, tiol, et sekundært amin, et tertiært amin, -S-, -S(O)- eller -S(O)₂-). I visse utførelsesformer omfatter minst én funksjonell gruppe med den målsøkende ligand et atom valgt fra gruppen bestående av O, N, S og P. Den funksjonelle gruppen med det målsøkende ligand kan for eksempel være valgt fra gruppen bestående av amino, amido, tiol, hydroksyl, eter, ester, karbonyl, karboksylsyre, sulfonamido, tioeter, tioester og tiokarbonyl.

Både den målsøkende ligand og chelatoren vil typisk ha én eller flere funksjonelle grupper. Funksjonelle grupper og beskyttende midler som kan anvendes for å danne en beskyttet funksjonell gruppe er beskrevet her. Fagpersoner på området vil forstå at hvilken som helst funksjonell gruppe kan beskyttes ved anvendelse av et beskyttende middel som nødvendig, som beskrevet her. En funksjonell gruppe kan beskyttes (*e.g.*, et beskyttet amin, så som -NH-Cbz) eller være ubeskyttet—også betegnet, “fri” (så som -NH₂). Som kjent for fagfolk på området er beskyttelsesgrupper anvendt i organisk syntese og ikke ved vandige synteseer.

Videre, i visse utførelsesformer kan én eller flere beskyttelsesgrupper fjernes. Fjerning av en beskyttelsesgruppe kan utføres når som helst ved hvilken som helst metode eller syntese beskrevet her, men blir typisk utført når beskyttelsesgruppen ikke lenger er nødvendig og den funksjonelle gruppen som er beskyttet ønskes “avdekket.” I hvilken som helst metode beskrevet her, og i hvilken som helst forbindelse omfattende en chelator som beskrevet her (*e.g.*, et chelator-målsøkende ligandkonjugat, et metallion-merket-chelator-målsøkende ligandkonjugat), kan eller kan ikke inneholde hvilke som helst beskyttelsesgrupper. For eksempel kan et område avbildes ved anvendelse av et metallion-

merket-chelator-målsøkende ligandkonjugat som ikke inneholder beskyttelsesgrupper eller inneholder én eller flere beskyttelsesgrupper.

I visse utførelsesformer omfatter den målsøkende ligand en utgående gruppe. Betegnelsen “utgående gruppe” angir generelt lett utskiftbare grupper med en nukleofil, så som et amin, en alkohol eller en tiol-nukleofil. Slike utgående grupper er velkjente og omfatter for eksempel karboksylater, N-hydroksysuccinimid, N-hydroksybenzotriazol, halogenider, triflater, tosylater, mesylater, alkoksider, tioalkoksider og sulfonyler e.

I ytterligere utførelsesformer danner de tre eller flere funksjonelle grupper på chelatoren sammen et chelat. Typisk danner tre eller fire atomer sammen et chelat. I visse utførelsesformer er chelatet valgt fra gruppen bestående av NS_2 , N_2S , S_4 , N_2S_2 , N_3S og NS_3 . For eksempel kan tre tioetere og ett sekundært amin danne et NS_3 chelat. I noen utførelsesformer, så som med etylendicystein, er chelatet et N_2S_2 chelat. Chelater kan være av hvilken som helst type kjent for fagfolk på området og er ytterligere beskrevet her. Andre atomer i tillegg til N og S kan utgjøre del av et chelat, så som oksygen.

Som anvendt her kan “chelate” anvendes som et substantiv eller et verb. Som et substantiv angir “chelate” ett eller flere atomer som enten er i stand til å chelate ett eller flere metallioner eller som chelaterer ett eller flere metallioner. Metallioner er beskrevet mer detaljert her. I noen utførelsesformer er kun ett metallion koordinert til et chelat. Et ikke-begrensende eksempel på “chelate” omfatter “et N_2S_2 ” chelat: dette betyr at to nitrogenatomer og to svovelatomer på en chelator enten a) er i stand til å chelate ett eller flere metallioner eller b) er koordinert til (eller chelatert til) ett eller flere metallioner. Følgelig, i noen utførelsesformer, er chelatet N_2S_2 . En forbindelse omfattende et chelat er en chelator. Typisk er kun ett metallion chelatert til en chelator.

I den innovative metoden ved syntese av et chelator-målligand-konjugat er A og D hver et beskyttet tiol. Tiolen kan beskyttes i minst ett trinn ved anvendelse av minst ett tiolbeskyttende middel. Det tiolbeskyttende middel kan være hvilket som helst av de kjent for fagfolk på området. For eksempel kan det tiolbeskyttende middel velges fra en gruppe bestående av et alkylhalogenid, et benzylhalogenid, et benzoylhalogenid, et sulfonylhalogenid, et trifenylmetylhalogenid, et metoksytrifenylmetylhalogenid og cystein.

I visse utførelsesformer kan minst ett amin beskyttes i ett eller flere trinn ved anvendelse av minst et aminbeskyttende middel. Aminbeskyttende midler kan være hvilket som helst av de kjent for fagfolk på området. For eksempel kan

aminbeskyttelsesgruppen velges fra gruppen bestående av benzyklorformiat, *p*-nitroklorbenzylformat, etylklorformiat, di-tert-butyl-dikarbonat, trifenylmetylklorid og metoksytrifenylmetylklorid.

I visse utførelsesformer er chelatoren etylendicystein. Ved anvendelse av etylendicystein som en chelator i syntesen av et etylendicystein-målsøkende ligandkonjugat, er de to tiolgruppene i etylendicystein beskyttet ved anvendelse av minst ett tiolbeskyttende middel (*e.g.*, ved anvendelse av to eller flere ekvivalenter av et tiolbeskyttende middel) og i et annet trinn er de to amingruppene i etylendicystein beskyttet ved anvendelse av minst ett aminbeskyttende middel (*e.g.*, ved anvendelse av to eller flere ekvivalenter av et aminbeskyttende middel). Siden tiolgruppene er mer reaktiv enn amingruppene vil tiol gruppene typisk beskyttes før amingruppene når begge initielt er ubeskyttet (“frie”).

Som nevnt kan konjugering mellom chelatoren og et målsøkende ligand skje via hvilken som helst metode og kjemiske bindinger kjent for fagfolk på området. Det vil si at, den målsøkende ligand kan være konjugert eller bundet til én eller flere chelatorer på hvilken som helst måte kjent for fagfolk på området. I visse utførelsesformer finner konjugering mellom chelatoren og det målsøkende ligand sted i et enkelt trinn (*dvs.*, en “one-pot” reaksjon). Som kjent for fagfolk på området er slike ett-trinnsreaksjoner ønskelig da de sparer tid, minimaliserer reagenser som avfall og minimaliserer tap av produkt. Hvilken som helst av A, D, E og/eller F kan delta i konjugering til et målsøkende ligand. I tillegg kan hvilken som helst av A, D, E og/eller F delta i chelatering. Videre kan hvilken som helst av A, D, E og/eller F delta både i chelatering og konjugering. Slik fleksibilitet tillater chelatorene å kunne manipuleres på en rekke måter, avhengig av for eksempel reaktiviteten til et valgt målsøkende ligand, selektiviteten av den ønskede konjugering, oppløseligheten av reagensene, metallionet ønsket for chelatering, *etc.* Typisk, men ikke alltid, forekommer konjugering før chelatering.

Typisk er én type av målsøkende ligand konjugert til én chelator, men flere målsøkende ligander kan også være konjugert til en enkel chelator. Vanligvis, ved organisk syntese av chelator-målsøkende ligandkonjugater som mellom chelatoren og det målsøkende ligand, virker én som nukleofil og én som elektrofil slik at konjugering finner sted via en kovalent binding. Den kovalente binding kan være hvilken som helst type kjent for fagfolk på området. I noen utførelsesformer er den kovalent binding valgt fra gruppen

bestående av en amidbinding, en eterbinding, en esterbinding, en tioeterbinding, en tioesterbinding, en sulfonamidobinding og en karbon-karbon binding. Karbon-karbon-bindingen er typisk en enkeltbinding, men kan også være en dobbelt- eller en trippelbinding. Når de virker som elektrofiler kan chelatorer og målsøkende ligander omfatte funksjonelle grupper så som halogenatomer og sulfonyler, som fungerer som utgående grupper under konjugeringen. I noen utførelsesformer finner konjugeringen sted på én eller flere funksjonelle grupper av chelatoren valgt fra gruppen bestående av karboksylsyre, amin og tiol. Målsøkende ligander kan også omfatte nukleofile grupper, så som $-NH_2$, som kan delta i konjugering med en elektrofil chelator. Typer av konjugering er beskrevet mer detaljert nedenfor.

I visse utførelsesformer omfatter chelator-målsøkende ligandkonjugat videre en linker mellom chelatoren og det målsøkende ligand. Slike linkere kan for eksempel gi lettere konjugering mellom chelatoren og det målsøkende ligand ved å tilveiebringe en reaktiv gruppe som letter konjugasjonsreaksjonen. Bindingene kan være av hvilken som helst type kjent for fagfolk på området. Bindingene kan være initielt bundet til chelatoren eller til det målsøkende ligand. En linker kan være bundet til chelatoren, mens en annen linker er bundet til det målsøkende ligand, slik at de to linkere samtidig kan være bundet til hverandre. Fagpersoner på området vil være fortrolig med ulike typer av linkere tilgjengelig for metoder ifølge foreliggende oppfinnelse. I noen utførelsesformer er bindingene valgt fra gruppen bestående av et peptid, glutaminsyre, asparaginsyre, brometylacetat, etylendiamin, lysin og hvilken som helst kombinasjon av én eller flere av disse gruppene.

I visse utførelsesformer er E og F hver uavhengig valgt fra gruppen bestående av $-COOH$, $-NH_2$ eller tiol. I noen utførelsesformer er E og F begge $-COOH$. I visse utførelsesformer finner konjugeringen av minst ett målsøkende ligand sted på E og/eller F. I visse utførelsesformer er hver av A og D hver beskyttet med minst én beskyttelsesgruppe før konjugering.

Som en fagmann på området ville oppfatte, for å konjugere en chelator til et målsøkende ligand, må minst én funksjonell gruppe på chelatoren og minst én funksjonell gruppe på det målsøkende ligand være "fri" (dvs., ubeskyttet med en beskyttelsesgruppe) slik at de to forbindelser kan forbindes.

Chelatoren kan videre omfatte et avstandsstykke "(spacer)", X. I visse aspekter tillater anvendelse av et avstandsstykke et passende antall og orientering av chelaterende atomer for å chelatere et metallion. Fagpersoner på området vil være fortrolig med ulike avstandsstykker som kan anvendes for metoder ifølge foreliggende oppfinnelse og eksempler på avstandsstykker er beskrevet nedenfor. For eksempel kan et alkyl avstandsstykke så som $(-CH_2)_n$, hvor n er 1-100 anvendes. En type chelator som er anvendbar ved metoder ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter et etylen-avstandsstykke, etylendicystein (EC). I visse utførelsesformer er $X-CH_2-C(O)-$, $-C(O)-CH_2-$, $-CH_2-CH_2-C(O)-$ eller $-C(O)-CH_2-CH_2-$ og B og/eller C er et sekundært amin. Denne utførelsesform resulterer typisk i at enten B eller C er mindre nukleofil enn den andre. For eksempel, hvis B, C og L sammen er vist som $-NH-C(O)-CH_2-CH_2-NH-$, vil det sekundære amin i stilling C være mer nukleofil enn det sekundære amin i B. Således vil C være mer reaktiv hvilket resulterer i selektiv konjugering av et målsøkende ligand i stilling C. I visse utførelsesformer er både stillingene A og D eller E og F hver beskyttet med minst én beskyttelsesgruppe før konjugering på C.

Ett trekk ved ved anvendelse av amidbindinger, så som når B, C og L sammen danner $-NH-C(O)-CH_2-CH_2-NH-$, ligger i det faktum at reaksjoner hvor et metallion er chelatert til en chelator ofte finne sted i et surt medium. Amidbindinger er relativt resistent mot nedbrytning i surt medium og gir derfor strukturell stabilitet til chelatoren under slike chelateringsreaksjoner. Således kan X sammen med B og/eller C omfatte en amidbinding.

Chelator-målsøkende ligandkonjugater chelatert til et metallion kan ha en funksjon som for eksempel avbildnings- og/eller diagnostiske midler, som beskrevet her. De kan også ha en funksjon som terapeutiske midler eller midler for kombinert diagnose og terapi eller kombinert avbildning og terapi. Følgelig, i visse utførelsesformer, omfatter metoder ifølge foreliggende oppfinnelse videre chelatering av et metallion til en chelator for å danne et metallionmerket-chelator-målsøkende ligandkonjugat. Metallionet kan være hvilken som helst av de kjent for en fagmann på området. Metallionet kan være et "kaldt" (ikke-radioaktivt) metallion eller et radionuklid. I ikke-begrensede eksempler kan metallionet velges fra gruppen bestående av et technesiumion, et kobberion, et indiumion, et talliumion, et galliumion, et arsenion, et rheniumion, et holmiumion, et yttriumion, et samariumion, et selenion, et strontiumion, et gadoliniumion, et vismution, et jernion, et manganion, et luteciumion, et koboltion, et platinaion, et kalsiumion og et rhodiumion.

Det kalde metallionet kan for eksempel være valgt fra gruppen bestående av Cu-62, As-72, Re-187, Gd-157, Bi-213, Fe-56, Mn-55, et jernion, et manganion, et koboltion, et platinaion og et rhodiumion.

Metallionet kan være et radionuklid og kan være hvilken som helst radionuklid kjent for fagfolk på området. Radionuklidet, i noen utførelsesformer, kan velges fra gruppen bestående av ^{99m}Tc , ^{188}Re , ^{186}Re , ^{153}Sm , ^{166}Ho , ^{90}Y , ^{89}Sr , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{111}In , ^{148}Gd , ^{55}Fe , ^{225}Ac , ^{212}Bi , ^{211}At , ^{45}Ti , ^{60}Cu , ^{61}Cu , ^{67}Cu og ^{64}Cu . I noen utførelsesformer er metallionet ^{99m}Tc .

Hvis metallionet er valgt å være ^{99m}Tc kan for eksempel metoden videre omfatte tilsetning av et reduksjonsmiddel. Reduksjonsmidlet kan være hvilket som helst kjent for fagfolk på området. I noen utførelsesformer omfatter reduksjonsmidlet et ion valgt fra gruppen bestående av et ditionittion, et tinnion og et jern(II)ion. I noen utførelsesformer, er metallionet ^{188}Re . I andre utførelsesformer er metallionet ^{68}Ga .

Når et metallion blir anvendt ved metoden ifølge foreliggende oppfinnelse, kan metallionet være chelatert til hvilket som helst chelat kjent for fagfolk på området, som beskrevet her. Fagfolk på området gjenkjenner at metallioner chelaterer til et varierende antall atomer avhengig av for eksempel typen metall, dens valens og atomene tilgjengelig for chelatering. For eksempel kan tre eller fire atomer på chelatoren chelatere til ett metallion. I visse utførelsesformer kan et chelatert metallion være ^{99m}Tc . I visse utførelsesformer kan et chelatert metallion være ^{186}Re . I visse utførelsesformer kan et chelatert metallion være ^{187}Re .

I noen utførelsesformer kan chelatet velges fra gruppen bestående av NS_2 , N_2S , S_4 , N_2S_2 , N_3S og NS_3 . I visse utførelsesformer kan hvilken som helst én eller flere av disse chelater ikke være et chelat. I noen utførelsesformer er N_3S ikke et chelat. I visse utførelsesformer er chelatet N_2S_2 , for eksempel etylendicystein. Metoder ifølge foreliggende oppfinnelse kan videre omfatte syntese av et metallionmerket-chelator-målsøkende ligandkonjugat hvor det målsøkende ligand deltar med A, B, C, D, E og/eller F i chelatering til et metallion. Metallioner, chelatering og målsøkende ligander er beskrevet mer detaljert nedenfor. I noen utførelsesformer kan metallionet avbildes. Avbildningen kan være ved hvilken som helst metode kjent for fagfolk på området. Eksempler på metoder for avbildning er beskrevet nedenfor og omfatter PET og SPECT.

Som beskrevet ovenfor gir metallionmerkede-chelator-målsøkende ligandkonjugater fremstilt via organisk syntese typisk høyere renhet enn de oppnådd via vandig fremstilling. For eksempel, i noen utførelsesformer av foreliggende oppfinnelse, er metallionmerket-chelator-målsøkende ligandkonjugat dannet via organiske metoder mellom ca. 90% og ca. 99,9% rent, sammenlignet med mellom ca. 50% og ca. 70% rent for det vandige produktet. I visse utførelsesformer, er metallionmerkede-chelator-målsøkende ligandkonjugater syntetisert via organisk metoder omtrent eller minst ca. 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9% rent eller høyere eller hvilket som helst område avledet av dette.

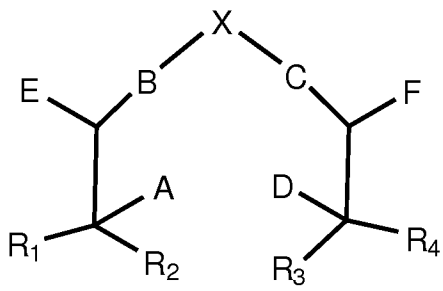
Hvilken som helst chelator beskrevet her kan være chelatert til et metallion. En beskyttet chelator eller en ubeskyttet chelator kan anvendes. Chelatoren kan være chelatert før eller etter at chelatoren er rensset.

I visse utførelsesformer omfatter dannelse av et metallionmerket-chelator-målsøkende ligand konjugat:

- (a) fjerning av minst én beskyttelsesgruppe fra det chelator-målsøkende ligandkonjugat som beskrevet her; og
- (b) chelatering av et metallion til chelatoren til det chelator-målsøkende ligandkonjugat.

I visse utførelsesformer omfatter dannelse av et metallionmerket-chelator-målsøkende ligand konjugat:

- (a) tilveiebringe en chelator med den følgende formel:



hvor chelatoren er etylendicystein (EC), og hvor de to tiolgruppene og de to aminogruppene av etylendicystein er beskyttet; dvs. hvor:

- A og D er hver et beskyttet tiol;
 - B og C er hver et tertiært amin;
 - E og F er hver -COOH;
 - R₁, R₂, R₃ og R₄ er hver H;
- 5 - X er -CH₂-CH₂-;
- (b) konjugere chelatoren til en målsøkende ligand for å danne et chelator-målsøkende ligandkonjugat;
 - (c) fjerning av minst én beskyttelsesgruppe fra det chelator-målsøkende ligandkonjugat; og
- 10 (d) chelatere et metallion som beskrevet her til chelatoren i det chelator-målsøkende ligandkonjugat.

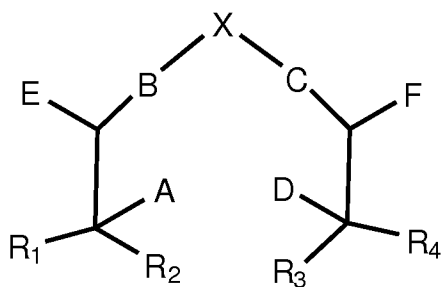
Det er antatt at hvilken som helst forbindelse beskrevet her omfattende én eller flere beskyttelsesgrupper kan, ved hvilken som helst spesiell metode, gjennomgå fjerning av én eller flere beskyttelsesgrupper. En beskyttelsesgruppe kan fjernes som beskrevet her, for eksempel fra chelatorgruppen, den målsøkende ligandgruppe eller begge grupper i ett eller flere trinn før eller etter at et chelator-målsøkende ligandkonjugat er chelatert til et metallion. Beskyttelsesgrupper er beskrevet mer detaljert her, omfattende deres installasjon og fjerning.

I andre utførelsesformer omfatter dannelse av et metallion merket-chelator-målsøkende ligandkonjugat:

- (a) å chelatere et metallion til chelatoren som beskrevet her for å danne et metallion merket-chelator;
- (b) konjugering av metallionmerket-chelator til et målsøkende ligand; og
- (c) fjerning av én eller flere beskyttelsesgrupper fra metallionmerket-chelator-målsøkende ligandkonjugat.

Visse utførelsesformer av foreliggende oppfinnelse forutsetter en metode for syntese av en beskyttet chelator omfattende:

- (a) tilveiebringe en chelator med den følgende formel:



hvor chelatoren er etylendicystein (EC), og hvor de to tiolgruppene og de to aminogruppene av etylendicystein er beskyttet; dvs. hvor:

- A og D er hver et beskyttet tiol;
 - 5 - B og C er hver et tertiært amin;
 - E og F er hver -COOH;
 - R₁, R₂, R₃ og R₄ er hver H;
 - **X er -CH₂-CH₂; og** (b) beskytte -COOH, -NH₂ eller tiol ved anvendelse av
- henholdsvis et karboksylsyrebeskyttende middel, et aminbeskyttende middel eller et
- 10 tiolbeskyttende middel.

Som for hvilken som helst syntesemetode ifølge foreliggende oppfinnelse kan metoden utføres i et organisk medium. Den beskyttede chelator kan være beskyttet etylendicystein. Metoden kan videre omfatte et rensetrinn, et chelateringstrinn omfattende chelatering av et metallion, fjerning av minst én beskyttelsesgruppe, eller hvilken som helst

15 kombinasjon av disse trinn. (Hvilken som helst metode beskrevet her kan omfatte et rensetrinn, et chelateringstrinn omfattende chelatering av et metallion, fjerning av minst én beskyttelsesgruppe eller hvilken som helst kombinasjon av disse trinn.) I denne eller hvilken som helst metode beskrevet her kan den beskyttede chelator være ca. 80% til ca. 99,9% ren. For eksempel kan den beskyttede chelator være ca. 80% til ca. 90% ren. I

20 denne eller hvilken som helst metode beskrevet her omfattende en chelator med kjernestruktur vist ovenfor, når A og D begge er -NH₂, kan hverken B eller C være et sekundært eller et tertiært amin.

Konjugatet kan være mellom ca. 80% og ca. 99,9% rent. Konjugatet kan være mellom ca. 90% og ca. 99,9% rent. Konjugatet kan være ytterligere definert som et metallionmerket-chelator-målsøkende ligandkonjugat. Konjugatet kan være videre definert som ^{99m}Tc-EC-glucosamin, ¹⁸⁶Re-EC-glucosamin eller ¹⁸⁷Re-EC-glucosamin.

25

En "målsøkende ligand" er definert her til å være et molekyl eller del av et molekyl som binder spesifikt til et annet molekyl. En fagmann på området vil være kjent med en rekke midler som kan anvendes som målsøkende ligander i sammenheng med foreliggende oppfinnelse. Det målsøkende ligand kan være hvilket som helst slikt molekyl kjent for fagfolk på området. Ikke-begrensede eksempler på målsøkende ligander omfatter en vev-spesifikk ligand, et antimikrobielt middel, et antifungalt middel eller et avbildningsmiddel.

Ifølge foreliggende oppfinnelse er den målsøkende ligand anvendt i fremgangsmåten for syntetisering av et chelator-målligand-konjugat et middel som etterligner glukose. Ikke-begrensede eksempler på midler som etterligner glukose omfatter deoksyglukose, glucosamin, tetraacetyliert glucosamin, neomycin, kanamycin, gentamycin, paromycin, amikacin, tobramycin, netilmicin, ribostamycin, sisomicin, mikromicin, lividomycin, dibekacin, isepamicin, astromicin og aminoglykosid. En spesiell utførelsesform som etterligner glukose er glucosamin.

15

Ytterligere utførelsesformer angår en forbindelse for anvendelse i en fremgangsmåte for å diagnostisere en sykdom, eller behandle en sykdom, hvor forbindelsen er et konjugat mellom en chelator og et middel som etterligner glukose, hvor midlet som etterligner glukose, omfatter glukosamin eller deoksyglukose, og hvor chelatoren og midlet som etterligner glukose, er konjugert via en amidbinding eller en esterbinding, hvor forbindelsen er oppnåelig ved fremgangsmåten i krav 1 eller 3 (med trinnene (b) og (d)), hvor konjugatet er merket med et metallion valgt fra ^{99m}Tc , ^{68}Ga , ^{188}Re , platina og ^{187}Re , og hvor renheten av konjugatet er mellom ca. 70 % (vekt/vekt) og ca. 99,9 % (vekt/vekt), og hvor sykdommen som skal diagnostiseres eller behandles, er myokardinfarkt, myokardiskemi, kongestiv hjertesvikt, kardiomyopati, valvulær hjertesykdom, arytmi eller angina pectoris.

25

. I visse utførelsesformer er det metallionmerkede-chelator-conjugat mellom ca. 90% og ca. 99,9% rent. I visse utførelsesformer er det metallionmerkede-chelator-conjugat mellom ca. 80% og ca. 99,9% rent. I visse utførelsesformer er det metallionmerkede-chelator-conjugat mellom ca. 70% og ca. 99,9% rent.

30

Metallionmerket-chelator-conjuguatet omfatter etylendicystein. Metallionet kan for eksempel være hvilken som helst av de metallioner angitt ovenfor.

Individet kan være hvilket som helst individ, så som et pattedyr eller dyremodeller anvendt for å bedømme tilstedeværelsen av kardiovaskulær sykdom. Pattedyret kan for eksempel være et menneske eller av apeslekten. Dyremodeller omfatter hunder, katter, 5 rotter, mus eller kaniner. I foretrukne utførelsesformer er individet et menneske med kjent eller mistenkt kardiovaskulær sykdom.

Individet kan for eksempel være en pasient som i klinikk har symptomer på eller indikativ for myokardial ischemi eller myokardialt infarkt. Avbildning av hjertet til 10 individet for å diagnostisere sykdom kan involvere administrering til individet en farmasøytisk effektiv mengde av et metallionmerket chelator-målsøkende ligandkonjugat syntetisert ved anvendelse av hvilken som helst av metodene angitt her. Avbildning kan utføres ved anvendelse av hvilken som helst avbildningsmodalitet kjent for fagfolk på området. I spesielle utførelsesformer involverer avbildning anvendelse av 15 radionuklidbasert avbildningsteknologi, så som PET eller SPECT. I spesielle utførelsesformer er det metallionet-merkede radionuklid-målsøkende ligandkonjugatet $^{99m}\text{Tc-EC-glucosamin}$. Glucosamin tas ikke aktivt opp av levedyktig myokardialt vev, men er spesifikke mål for regioner av ischemi. Alvorlighetsgraden av ischemi kan bedømmes visuelt eller graderes avhengig av størrelsen på signalet som blir målt ved 20 anvendelse av hvilken som helst metode kjent for fagfolk på området. I noen utførelsesformer utføres avbildning ved anvendelse av hvilken som helst av konjugatene angitt ovenfor, før, under eller etter avbildning av hjertet ved anvendelse av et andre avbildningsmiddel. For eksempel kan det andre avbildningsmiddel være tallium avbildet med scintigrafi for å definere området med normal myokardial perfusjon (ikke-ischemisk 25 vev).

Myokardial perfusjon SPECT (MPS) består av en kombinasjon av en stressmodalitet (øvelse eller farmakologisk) med hvile og stress administrering og avbildning av radiofarmasøytika. Tallium har utmerkede fysiologiske egenskaper for myokardial perfusjonsavbildning. Ved å bli godt ekstrahert under de første passasjer 30 gjennom den koronare sirkulasjon, er et lineært slektskap mellom blodstrømmen til levedyktig myokardium og talliumopptak vist under øvelse; imidlertid, ved meget høye strømningsnivåer, vil en "roll-off" i opptaket forekomme. Tallium redistributes over tid

som en ubundet kaliumanalog. Dens innledende fordeling er proporsjonal med regional myokardial perfusjon og ved likevekt er distribusjonen av tallium proporsjonal med de regionale kaliumnivåer, noe som indikerer levedyktig myokardium. Mekanismene for talliumredistribusjon er differensiell utvaskingshastighet mellom hypoperfusert, men levedyktig myokardium og normale soner, og innvasking til initielt hypoperfuserte soner. 5 Utvaskningshastigheten til tallium er konsentrasjonsgradienten mellom den myokardiale celle og blodet. Det er langsommere blodutskillelse av tallium etter hvile eller lav-nivå øvelses injeksjon. Diffus langsom utvaskingshastighet, som etterligner diffus ischemi, kan observeres i normale pasienter som ikke oppnår tilstrekkelig stressnivåer. 10 Hyperinsulinemiske tilstander bremser redistribusjon, hvilket fører til en underestimering av levedyktig myokardium; således er faste anbefalt før og i 4 timer etter talliuminjeksjon. Dette er grunnen til at om EC-G blir anvendt som en middel i kombinasjon med tallium vil det treffe det nøyaktige område av interesse som ville være det ischemiske, men levedyktig området (*see Angello et al.*, 1987; Gutman *et al.*, 1983; Pohost *et al.*, 1977).

15 Avbildning ved anvendelse av hvilket som helst av de metallionmerkede chelator-målsøkende ligandkonjugater kan også utføres sammen med andre diagnostisk metoder, så som måling av hjerte-isozymer eller hjerte-kateterisering. Avbildningen kan utføres ved forskjellige intervaller etter at symptomene har startet eller kan utføres for å bedømme endringer i myokardial perfusjon over tid.

20 Ytterligere utførelsesformer angår en metode for avbildning av et hjerte hos et individ til hvilket forbindelsen er administrert, hvor forbindelsen er et konjugat mellom en chelator og et middel som etterligner glukose, hvor midlet som etterligner glukose, omfatter glukosamin eller deoksyglukose, og hvor chelatoren og midlet som etterligner glukose, er konjugert via en amidbinding eller en esterbinding, hvor forbindelsen er oppnåelig ved fremgangsmåten i krav 1 eller 3 (med trinnene (b) og (d)), hvor konjugatet er merket med et metallion valgt fra ^{99m}Tc , ^{68}Ga , ^{188}Re , platina og ^{187}Re , og hvor renheten av konjugatet er mellom ca. 70 % (vekt/vekt) og ca. 99,9 % (vekt/vekt), særlig hvor renheten av konjugatet er mellom ca. 80 % (vekt/vekt) og ca. 99,9 % (vekt/vekt) eller mellom ca. 90 % (vekt/vekt) og ca. 99,9 % (vekt/vekt),

30 og detektering av et signal fra metallionmerket-chelator-målsøkende ligandkonjugat som er lokalisert i hjertet. I visse utførelsesformer er det

metallionmerkede-chelator-målsøkende ligandkonjugat mellom ca. 90% og ca. 99,9% rent. Metallionmerket-chelator-målsøkende ligandkonjugatet omfatter etylendicystein.

Signalet kan detekteres ved hvilken som helst metode kjent for fagfolk på området. Ikke-begrensede eksempler på slike metoder omfatter PET, PET/CT, CT, SPECT, SPECT/CT, MRI, optisk avbildning og ultralyd.

Individet kan være hvilket som helst individ, så som et pattedyr eller fugle-arter. I spesielle utførelsesformer er pattedyret et menneske. Området som skal avbildes er

hjertet.

I noen utførelsesformer omfatter avbildningsmetoden videre utførelse av én eller flere ytterligere diagnostiske eller avbildningsprosedyrer for evaluering av en sykdom hos et individ. I ytterligere utførelsesformer er avbildningsmetoden videre definert som en metode for utføresle av samtidig avbildning og terapi.

I visse utførelsesformer er sykdommen som skal behandles en kardiovaskulær sykdom valgt fra myokardialt infarkt, kongestiv hjertesvikt, kardiomyopati, valvulær hjertesykdom, en arrhytia, medfødt hjertesykdom og angina pectoris.

Det er antatt at hvilken som helst utførelsesform beskrevet i denne beskrivelsen kan implementeres med hvilken som helst metode, forbindelse eller preparat ifølge oppfinnelsen og *vice versa*. Som anvendt her angir "organisk medium" løsninger (e.g., reaksjonsløsninger) og rensemetoder omfattende ett eller flere organiske løsningsmidler (også her betegnet "løsningsmidler"). Løsningsmiddelvalgene for metodene ifølge foreliggende oppfinnelse vil være kjent for en fagmann på området. Løsningsmiddelvalgene kan avhenge av, for eksempel hva som vil lette solubilisering av alle reagensene, eller for eksempel hva som vil promotere de ønskede reaksjoner (spesielt hvis reaksjonsmekanismen er kjent). Løsningsmidler kan for eksempel omfatte polare løsningsmidler og ikke-polare løsningsmidler. Løsningsmiddelvalgene omfatter, men er ikke begrenset til, dimetylformamid, dimetylsulfoksid, dioksan, metanol, etanol, heksan, metylenklorid og acetonitril. I noen foretrukne utførelsesformer omfatter løsningsmidlet etanol, dimetylformamid og dioksan. Mer enn ett løsningsmiddel kan velges for hvilken som helst spesiell reaksjon eller renseprosedyre. Vann (dvs. en vandig komponent) kan også blandes inn i hvilket som helst løsningsmiddelvalg; vann blir typisk tilsatt for å lette

solubilisering av alle reagensene. I visse utførelsesformer er den organiske komponenten av det organiske medium, basert på volum, omtrent eller minst ca. 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% eller 100% organisk løsningsmiddel sammenlignet med den vandige komponenten.

5 Ordet “konjugat” og “konjugert” er definert her som kjemisk kobling innen samme molekyl. For eksempel kan to eller flere molekyler og/eller atomer være konjugert via en kovalent binding og danne et enkelt molekyl. De to molekyler kan være konjugert til hverandre via en direkte forbindelse (*e.g.*, hvor forbindelsene er direkte tilknyttet via en kovalent binding) eller forbindelsene kan være konjugert via en indirekte forbindelse (*e.g.*,
10 hvor de to forbindelser er kovalent bundet til én eller flere linkere og danner et enkelt molekyl). I andre tilfeller kan et metallatom være konjugert til et molekyl via en chelateringsinteraksjon.

Betegnelsen “funksjonell gruppe” angir generelt hvorledes fagpersoner på området klassifiserer kjemiske reaktive grupper. Ikke-begrensede eksempler på funksjonelle
15 grupper omfatter karbon-karbon bindinger (omfattende enkelt-, dobbelt og trippelbindinger), hydroksyl (eller alkohol), amin, sulfhydryl (eller tiol), amid, eter, ester, tioeter, tioester, karboksylsyre og karbonylgrupper. Som anvendt her refererer “amin” og “amino” og andre lignende par av ord så som “hydroksy” og “hydroksyl” til samme funksjonelle gruppe og anvendes således omhverandre. Som anvendt her kan “amin”
20 referere til enten den ene eller både $-NH_2$ og $-NH-$.

Som anvendt her kan “chelate” anvendes som et substantiv eller et verb. Som et substantiv angir “chelate” én eller flere atomer som enten er i stand til å chelate én eller flere metallioner eller chelaterer til én eller flere metallioner. I foretrukne utførelsesformer koordineres kun ett metallion til et chelat. Ikke-begrensede eksempler på “chelate”
25 omfatter “et N_2S_2 ” chelat: dette betyr at to nitrogenatomer og to svovelatomer til en chelator enten er a) i stand til å chelate ett eller flere metallioner eller b) koordinert til (eller chelatert til) ett eller flere metallioner (fortrinnsvis kun ett metallion). Som et verb angir “chelate” fremgangsmåten med hvilken et metallion blir koordinert eller chelatert til for eksempel en chelator eller et chelator-målsøkende ligandkonjugat.

30 Som anvendt her angir en “ukonjugert chelator” en chelator som ikke er konjugert til et målsøkende ligand.

Som anvendt her angir en “ubeskyttet chelator” en chelator som ikke omfatter noen som helst beskyttelsesgrupper.

Som anvendt her angir en “beskyttet chelator” en chelator som omfatter minst én beskyttelsesgruppe.

5 Som anvendt her angir et “ubeskyttet målsøkende ligand” et målsøkende ligand som ikke omfatter noen som helst beskyttelsesgrupper.

Som anvendt her angir et “beskyttet målsøkende ligand” et målsøkende ligand som omfatter minst én beskyttelsesgruppe.

10 Betegnelsen “nukleofil” angir generelt atomer som bærer ett eller flere frie par av elektroner. Slike betegnelser er velkjent på området og omfatter -NH_2 , tiolat, karbanion og alkoholat (også kjent som hydroksyl).

Betegnelsen “elektrofil” angir generelt specier som reagerer med nukleofiler. Elektrophile grupper har typisk en partiell positiv ladning. Slike betegnelser er velkjent på området og omfatter karbonet til et karbonatom bundet til en utgående gruppe så som et halogen, sulfonyl eller en kvarternær aminogruppe.

Betegnelsen "utgående gruppe" generelt angir grupper som er lett utskiftbare med en nukleofil, så som et amin og alkohol eller en tiol-nukleofil. Slike utgående grupper er velkjente og omfatter karboksylater, N-hydroksysuccinimid, N-hydroksybenzotriazol, halogen (halogenider), triflater, tosylater, mesylater, alkoksy, tioalkoksy og sulfonyler.

20 Som anvendt her angir “alkyl” eller “alk” et lineært, forgrenet eller cyklisk karbon-karbon eller hydrokarbonkjede, eventuelt omfattende alken- eller alkynbinding, inneholdende 1-30 karbonatomer. “Lavere alkyl” angir alkylrester omfattende 1-4 karbonatomer. Ikke-begrensede eksempler på lavere alkyler omfatter metyl, etyl, propyl, butyl og isopropyl. “Substituert alkyl” angir en alkylrest substituert med minst ett atom
25 kjent for fagfolk på området. I visse utførelsesformer kan én eller flere substituenten velges fra gruppen bestående av hydrogen, halogen, okso (*e.g.*, eter), hydroksy, alkoksy, silyloksy, cykloalkyl, acyl, aryl, acetyl, karbonyl, tiokarbonyl, cyano, azido, amido, aminokarbonyl, amino, -NH-alkyl , -N(alkyl)_2 , -NH-cykloalkyl , -N(cykloalkyl)_2 , -NH-aryl , -N(aryl)_2 , trialkylsilyloksy, acyloksy, acylamino, bis-acylamino, ester, NO, NO₂ og sulfo
30 (*e.g.*, tioeter, tioester, sulfonamido, sulfonyl).

Betegnelsen "aryl" angir en karbocyklisk aromatisk gruppe, omfattende, men ikke begrenset til de valgt fra gruppen bestående av fenyl, naftyl, indenyl, indanyl, azulenyl, fluorenyl og antracenylyl; eller en heterocyklisk aromatisk gruppe, omfattende, men ikke begrenset til de valgt fra gruppen bestående av furyl, furanyl, tienyl, pyridyl, pyrrolyl, oksazolyl, tiazolyl, imidazolyl, pyrazolyl, pyrazolinyl, pyrazolidinyl, isoksazolyl, isotiazolyl, oksadiazolyl, triazolyl, tiadiazolyl, pyridazinyl, pyrimidinyl, pyrazinyl, triazinyl, tritianyl, indolizinyll, indolyl, isoindolyl, indolinyl, tiofenyl, indazolyl, benzimidazolyl, benzotiazolyl, purinyl, kinolizinyll, kinolinyl, isokinolinyl, innolinyl, ftalazinyl, kinazolinyll, kinoksalinyll, naftyridinyll, pteridinyll karbazolyl, akridinyll, fenazinyll, fenotiazonyll, fenokszinyll og hvilke som helst kombinasjoner eller derivater av én eller flere av disse grupper.

"Aryll" grupper, som definert i denne søknaden kan uavhengig inneholde én eller flere funksjonelle grupper som substituentter. I visse utførelsesformer kan substituentter velges fra gruppen bestående av hydrogen, alkyl, halogen, okso (*e.g.*, eter), hydroksy, alkoksy, silyloksy, cykloalkyl, acyl, aryl, acetyl, karbonyll, tiokarbonyll, cyano, amido, aminokarbonyll, amino, -NH-alkyl, -N(alkyl)₂, -NH-cykloalkyl, -N(cykloalkyl)₂, -NH-aryl, -N(aryl)₂, trialkylsilyloksy, acyloksy, acylamino, bis-acylamino, ester, NO, NO₂ og sulfo (*e.g.*, tioeter, tioester, sulfonamido, sulfonyll). Videre kan hvilken som helst av disse substituentter være ytterligere substituert med substituentter som nettopp beskrevet.

Som anvendt her angir betegnelsen "cykloalkyl" karbocykliske grupper eller heterocykliske grupper med tre eller flere atomer, ringenatomer hvilke eventuelt kan være substituert med C, S, O eller N og ringenatomer hvilke kan omfatte én eller flere funksjonelle gruppe som substituentter. Substituentter kan i noen utførelsesformer velges fra gruppen bestående av hydrogen, alkyl, halogen, okso (*e.g.*, eter), hydroksy, alkoksy, silyloksy, cykloalkyl, acyl, aryl, acetyl, karbonyll, tiokarbonyll, cyano, azido, amido, aminokarbonyll, amino, -NH-alkyl, -N(alkyl)₂, -NH-cykloalkyl, -N(cykloalkyl)₂, -NH-aryl, -N(aryl)₂, trialkylsilyloksy, acyloksy, acylamino, bis-acylamino, ester, NO, NO₂ og sulfo (*e.g.*, tioeter, tioester, sulfonamido, sulfonyll).

Betegnelsen "aminosyre" angir hvilken som helst av de naturlig forekommende aminosyrer, så vel som syntetiske analoger (*e.g.*, D-stereoisomerer av de naturlig forekommende aminosyrer, så som D-treonin) og derivater derav. α -aminosyrer omfatte et karbonatom til hvilket er bundet en aminogruppe, en karboksylgruppe, et hydrogenatom og

en distinkt gruppe referert til som en “sidekjede.” Aminosyrer omfattende en ytterligere metylengruppe i deres ryggrad er ofte betegnet β -aminosyrer. Sidekjedene for naturlig forekommende aminosyrer er velkjent på området og omfatter for eksempel hydrogen (e.g., som i glycin), alkyl (e.g., som i alanin, valin, leucin, isoleucin, prolin), substituert alkyl (e.g., som i treonin, serin, metionin, cystein, asparaginsyre, asparagin, glutaminsyre, glutamin, arginin og lysin), arylalkyl (e.g., som i fenylalanin og tryptofan), substituert arylalkyl (e.g., som i tyrosin) og heteroarylalkyl (e.g., som i histidin). Unaturlige aminosyrer er også kjent på området som angitt i for eksempel Williams (1989); Evans *et al.* (1990); Pu *et al.* (1991); Williams *et al.* (1991); og alle referanser angitt der. Foreliggende oppfinnelse omfatter også sidekjedene for unaturlige aminosyrer.

Betegnelsene “primært amin,” “sekundært amin” og “tertiært amin” refererer til aminer som er derivater av ammoniakk (NH_3), hvor én (primær), to (sekundær) eller tre (tertiær) av hydrogenatomene er erstattet av karbon, hvor nevnte karbon kan være bundet til hvilket som helst annet atom. I visse utførelsesformer er nevnte karbon (C) omfattet i X med formelen vist ovenfor, en hydrokarbongruppe (e.g., $-\text{CH}_2-$), $-\text{CH}(\text{E})(\text{CHAR}_1\text{R}_2)$, $-\text{CH}(\text{F})(\text{CHDR}_3\text{R}_4)$ eller en $-\text{C}(\text{O})-$ gruppe, hvor A, D, E, F, X, R_1 , R_2 , R_3 og R_4 er som definert her.

Forbindelser som beskrevet her kan inneholde ett eller flere asymmetriske sentere og kan således forekomme som racemater og racemiske blandinger, enkelt-enantiomerer, diastereomere blandinger og individuelle diastromerer. Alle mulige stereoisomerer av alle forbindelsene beskrevet her, hvis ikke angitt på annen måte, er ment å være innenfor omfanget av foreliggende oppfinnelse. De chirale sentere av forbindelsene kan ha S- eller R-konfigurasjon, som definert ved IUPAC 1974 Recommendations. Foreliggende oppfinnelse omfatter alle slik isomere former.

Den krevde oppfinnelsen er også ment å omfatte salter av hvilken som helst av de syntetiserte forbindelser. Betegnelsen “salt(er)” som anvendt her, skal forstås som sure og/eller basiske salter dannet med uorganiske og/eller organiske syrer og baser. Zwitterioner (interne eller inner-salter) skal forstås som omfattet innen betegnelsen “salt(er)” som anvendt her, som er kvaternære ammoniumsalter så som alkylammoniumsalter. Ikke toksiske, farmasøytisk akseptable salter er foretrukket som beskrevet nedenfor, selv om andre salter kan være anvendelige, som for eksempel ved isolerings- eller rensetrinn.

Ikke-begrensede eksempler på syreaddisjonssalter omfatter, men er ikke begrenset til acetat, adipat, alginat, aspartat, benzoat, benzensulfonat, bisulfat, butyrat, citrat, kamferat, kamfersulfonat, cyklopentanepropionat, digluconat, dodecylsulfat, etansulfonat, fumarat, glucoheptanoat, glycerofosfat, hemisulfat, heptanoat, heksanoat, hydroklorid, 5 hydrobromid, hydrojodid, 2-hydroksyetansulfonat, laktat, maleat, metansulfonat, 2-naftalensulfonat, nikotinat, oksalat, pectinat, persulfat, 3-fenylpropionat, pikrat, pivalat, propionat, succinat, tartrat, tiocyanat, tosylat og undekanoat.

Ikke-begrensede eksempler på basiske salter omfatter, men er ikke begrenset til ammoniumsalter; alkalimetallsalter så som natrium, litium og kaliumsalter; 10 jordalkalimetallsalter så som kalsium og magnesiumsalter; salter omfattende organiske baser så som aminer (*e.g.*, dicykloheksylamin, alkylaminer så som *t*-butylamin og *t*-amylamin, substituerte alkylaminer, aryl-alkylaminer så som benzylamin, dialkylaminer, substituerte dialkylaminer så som N-metyl glucamin (spesielt N-metyl D-glucamin), trialkylaminer og substituerte trialkylaminer); og salter omfattende aminosyrer så som 15 arginin, lysin og så videre. De basiske nitrogen-inneholdende grupper kan være kvarternisert med midler så som lavere alkylhalogenider (*e.g.* metyl, etyl, propyl og butylklorider, bromider og jodider), dialkylsulfater (*e.g.* dimetyl, dietyl, dibutyl og diamylsulfater), langkjedede halogenider (*e.g.* decyl, lauryl, myrtistyl og stearylklorider, bromider og jodider), arylalkylhalogenider (*e.g.* benzyl og fenetylbromider) og andre 20 kjente på området.

Anvendelse av ordet “en” når anvendt sammen med betegnelsen “omfattende” i kravene og/eller spesifikasjonen kan bety en, men er også i overensstemmelse med betydningen av “en eller flere,” “minst en,” og “en eller flere enn en.”

Gjennom hele denne søknaden blir betegnelsen “omtrent” anvendt for å indikere at 25 en verdi som omfatter den iboende feilen for anordningen, dvs. metoden som anvendes for å bestemme verdien eller variasjonen som eksisterer blant undersøkelses-subjektene. For eksempel kan “omtrent” være innenfor 10%, fortrinnsvis innen 5%, mer foretrukket innen 1% og mest foretrukket innen 0,5%.

Anvendelse av betegnelsen “eller” i kravene blir anvendt for bety “og/eller”, hvis 30 ikke eksplisitt angitt for å referere til kun alternativer eller hvor alternativene er gjensidig utelukkende, selv om beskrivelsen støtter en definisjon som kun angir alternativer og “og/eller.”

Som anvendt i denne beskrivelsen og krav(ene) er begrepene “omfattende” (og hvilke som helst former av omfattende, så som “omfatte” og “omfatter”), “som har”, eller “inneholdende” (og hvilke som helst form av inneholdende, så som “inneholder” og “inneholde”) fullstendige eller åpne, og utelukker ikke ytterligere ikke beskrevne elementer eller metodetrinn.

Andre formål, trekk og fordeler ifølge foreliggende oppfinnelse vil være tydelig fra den følgende detaljerte beskrivelse. Det skal imidlertid forstås at selv om den detaljerte beskrivelsen og de spesifikke eksempler indikerer foretrukne utførelsesformer ifølge oppfinnelsen er disse kun gitt som illustrasjon.

KORT BESKRIVELSE AV TEGNINGENE

De følgende tegninger er en del av foreliggende spesifikasjon og er inkludert for ytterligere å demonstrere visse aspekter ved foreliggende oppfinnelse. Oppfinnelsen kan være bedre forstått ved referanse til én eller flere av disse tegninger i kombinasjon med den detaljerte beskrivelsen av de spesifikke utførelsesformer presentert her.

FIG. 1. Ikke-begrensende eksempel på en organisk syntese av etylendicystein-glucosamin (EC-G).

FIG. 2. Ikke-begrensende eksempel på en organisk syntese av rhenium-etylendicystein-glucosamin (Re-EC-G).

FIG. 3. [³H]Thymidin innføringsforsøk ved anvendelse av Re-EC-G og en lymfom cellelinje.

FIG. 4. Sammenligning av cellulært opptak av Ec-G i rå form eller preparativ HPLC-renset form.

FIG. 5. Massespektrometri av EC-G.

FIG. 6. Radio-TLC (tynnskikt-kromatografi) av ⁶⁸Ga-EC-G. (a) ⁶⁸Ga-EC-G, syntetisert via organiske metoder; (b) ⁶⁸Ga-EC-G, syntetisert via vandige metoder; (c) fri ⁶⁸Ga.

FIG. 7. Analytisk radio-HPLC av ⁶⁸Ga-EC-G. (a) UV deteksjon; (b) NaI deteksjon.

FIGs. 8A og 8B. Stabilitet av ^{68}Ga -EC-G i hundeserum som vist ved radio-TLC. (a) ^{68}Ga -EC-G (0,7 mg/0,7 ml, pH 7,5, 865 μCi); (b) 100 μL ^{68}Ga -EC-G i 100 μL hundeserum, tid = 0; (c) tid = 30 min.; (d) tid = 60 min.; (e) tid = 120 min.; (f) ^{68}Ga -EC-BSA.

5 **FIG. 9.** Stabilitet av ^{68}Ga -EC-G i hundeserum som analysert i et proteinbindingsforsøk.

FIG. 10. *In vitro* opptaksundersøkelse av ^{68}Ga -merkede forbindelser i brystkreftcellelinje 13762.

10 **FIG. 11.** Planare bilder av $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -EC-ESMOLOL derivatet (300 μCi /rotte) i brysttumor-bærende rotter. H/UM = hjerte/øvre mellomhinne telletetthet-(telling/pixel)-forhold ved 15-45 minutter.

FIG. 12. ^{68}Ga -EC-TML PET avbildning i en New Zealand hvit kanin.

FIG. 13. Ikke-begrensende eksempel på en organisk syntese av etylendicystein-glucosamin (EC-G).

15 BESKRIVELSE AV ILLUSTRATIVE UTFØRELSIFORMER

Foreliggende oppfinnere har identifisert nye syntesemetoder for fremstilling av chelator-målsøkende ligandkonjugater eventuelt chelatert til én eller flere metallioner. Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer videre synteser av chelatorer, så som ikke-konjugerte chelatorer, beskyttede chelatorer (dvs. chelatorer hvor én eller flere funksjonelle grupper er beskyttet ved anvendelse av et beskyttende middel) og metallion merkede-
 20 chelatorer (dvs. chelatorer som er chelatert til én eller flere metallioner). Disse syntesemetoder omfatter generelt anvendelse av organiske løsningsmidler og syntetiske organiske prosedyrer og rensemetoder. Metoder basert på våt (vandig) kjemi er også gitt. Forbindelser som er et resultat av slike organiske kjemi-metoder har høy renhet, spesielt
 25 sammenlignet med forbindelser fremstilt ved våt kjemi. Chelatoren i foreliggende oppfinnelse er etylendicystein. . Metallioner chelatert til forbindelser kan videre gjøre forbindelsen anvendelige for avbildning, diagnostisk eller terapeutisk anvendelse. Forbindelser, metoder for deres syntese og deres anvendelse er ytterligere beskrevet nedenfor.

A. Chelatore

Fagpersoner på området vil være fortrolig med forbindelser som er i stand til å chelatere én eller flere metallioner (“chelatorer”). Chelatorer anvendt ved metoden ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter generelt én eller flere atomer som er i stand til å chelatere til én eller flere metallioner. . Typisk chelaterer en chelator til ett metallion.

Chelatering av et metallion til en chelator kan være ved hvilken som helst metode kjent for fagfolk på området. Metoder for chelatering (også betegnet koordinering) er beskrevet mer detaljert nedenfor. Atomer tilgjengelig for chelatering er kjent for fagfolk på området og omfatter typisk O, N eller S. I foretrukne utførelsesformer er atomene tilgjengelige for chelatering valgt fra gruppen bestående av N og S. I visse foretrukne utførelsesformer er metallionet chelatert til en gruppe atomer, referert til her som “chelater,” valgt fra gruppen bestående av NS₂, N₂S, S₄, N₂S₂, N₃S og NS₃. Chelatering kan også forekomme blant både chelatoren og det målsøkende ligand—*i.e.*, både chelatoren og det målsøkende ligand kan bidra med atomer som chelaterer samme metallion.

I visse utførelsesformer omfatter chelatoren forbindelser som omfatter én eller flere aminosyrer. Aminosyrene vil typisk være valgt fra gruppen bestående av cystein og glycin. For eksempel kan chelatoren omfatte tre cysteiner og én glycin eller tre glyciner og én cystein. Som beskrevet nedenfor kan et avstandsstykke forbinde én aminosyre til en annen.

Det er velkjent for fagfolk på området at chelatorer generelt omfatter en rekke funksjonelle grupper. Ikke-begrensede eksempler på slike funksjonelle grupper omfatter hydrokso, tiol, amin, amido og karboksylsyre.

1. Bis-aminoetantiol (BAT) dikarboksylsyrer

Etylendicystein (EC), den anvendte chelatoren i foreliggende oppfinnelse, er en bis-aminoetantiol (BAT) dikarboksylsyre. BAT dikarboksylsyrer kan virke som tetradentate ligander og er også kjent som diaminoditiol (DADT) forbindelser. Slike forbindelser er kjent for å danne stabile Tc(V)O-komplekser på basis av effektiv binding av oksoteknesium gruppen til to tiol-svovel- og to amin-nitrogenatomer. ^{99m}Tc merket dietylsteren (^{99m}Tc-L,L-ECD) er kjent som et hjernemiddel. ^{99m}Tc-L,L-etylendicystein (^{99m}Tc-L,L-EC) er dens mest polare metabolitt og ble oppdaget å bli utskilt raskt og

effektivt i urin. Således har $^{99m}\text{Tc-L,L-EC}$ vært anvendt som et nyre-funksjonsmiddel. (Verbruggen *et al.* 1992). Andre metaller så som indium, rhenium, gallium, kobber, holmium, platina, gadolinium, lutecium, yttrium, kobolt, kalsium og arsen kan også chelateres til BAT dikarboksylysyrer så som EC.

5 2. **Avstandsstykker**

Etylendicystein (EC), den anvendte chelatoren i foreliggende oppfinnelse, binder to aminosyrer gjennom et avstandsstykke. Slike avstandsstykker er velkjent for fagfolk på området. Disse avstandsstykker gir generelt ytterligere fleksibilitet til den endelige forbindelse som lett kan chelaterer én eller flere metallioner til chelatoren.

10 **B. Beskyttelsesgrupper**

Når en kjemisk reaksjon skal utføres selektivt på et reaktivt sete i en multifunksjonell forbindelse må andre reaktive seter ofte midlertidig blokkeres. En “beskyttelsesgruppe,” som anvendt her, er definert som en gruppe anvendt for formålet med denne midlertidige blokkering. Således er funksjonen til en beskyttelsesgruppe å beskytte én eller flere funksjonelle grupper (*e.g.*, $-\text{NH}_2$, $-\text{SH}$, $-\text{COOH}$) under påfølgende reaksjoner som ikke ville forløpe godt, enten fordi den frie (med andre ord, ubeskyttede) funksjonelle gruppe ville reagere og være funksjonalisert på en måte som er ikke er i overensstemmelse med dens behov for å være fri for påfølgende reaksjoner, eller den frie funksjonelle gruppe ville interfare i reaksjonen. Fagpersoner på området gjenkjenner at anvendelse av beskyttelsesgrupper er typisk i syntetisk organisk kjemi.

Under syntesen av forbindelsene må ulike funksjonelle grupper være beskyttet ved anvendelse av beskyttende midler i ulike trinn i syntesen. Et “beskyttende middel” blir anvendt for installasjon av beskyttelsesgruppen. Således, i en typisk prosedyre blir et beskyttende middel blandet inn med en forbindelse med en funksjonell gruppe som skal beskyttes og det beskyttende middel danner en kovalent binding med den funksjonelle gruppen. På denne måten blir den funksjonelle gruppen “beskyttet” av en beskyttelsesgruppe (og gjøres effektivt ikke-reaktiv) ved den kovalente binding som dannes med beskyttelsesmidlet. Multiple funksjonelle grupper kan beskyttes i ett eller flere trinn ved anvendelse av passende valgte beskyttelsesmidler. Slike passende valg er forstått av fagfolk på området. Slike valg er ofte basert på den varierende reaktivitet til de

funksjonelle gruppene som skal beskyttes: således beskyttes mer reaktive grupper (så som svovel/tiol) typisk før de mindre reaktive grupper (så som amin).

Det er flere metoder velkjent for fagfolk på området for å utføre slike trinn. For beskyttende midler, deres reaktivitet, installation og anvendelse, se, *e.g.*, Green og Wuts (1999). Samme beskyttelsesgruppe kan anvendes for å beskytte én eller flere av samme eller ulike funksjonelle gruppe(r). Ikke-begrensede eksempler på beskyttelsesgruppe installasjon er beskrevet nedenfor.

Anvendelse av uttrykket “beskyttet hydroksy” eller “beskyttet amin” og lignende betyr ikke at alle slike funksjonelle grupper tilgjengelig for beskyttelse er beskyttet. Tilsvarende betyr en “beskyttet chelator” som anvendt her, ikke at hver funksjonell gruppe i chelatoren er beskyttet.

Forbindelser anvendt og fremstilt under utførelse av metoden ifølge foreliggende oppfinnelse, er forutsatt å være i både beskyttede og ubeskyttede (eller “frie”) former. Fagpersoner på området vil forstå at funksjonelle grupper nødvendig for en ønsket transformasjon skal være ubeskyttet.

Når en beskyttelsesgruppe ikke lenger er nødvendig blir den fjernet ved metoder velkjent for fagfolk på området. For avbeskyttelsesmidler og anvendelse av dem, se, *e.g.*, Green og Wuts (1999). Midler anvendt for å fjerne beskyttelsesgruppen er typisk betegnet avbeskyttelsesmidler. Beskyttelsesgrupper er typisk lett fjernbare (som er kjent for fagfolk på området) ved metoder ved anvendelse av avbeskyttelsesmidler som er velkjent for fagfolk på området. For eksempel kan acetater- og karbamat-beskyttelsesgrupper lett fjernes ved anvendelse av milde sure eller basiske betingelser, selv om benzyl- og benzoylester-beskyttelsesgrupper trenger mye sterkere sure eller basiske betingelser. Det er velkjent at visse avbeskyttelsesmidler fjerner noen beskyttelsesgrupper og ikke andre, mens andre avbeskyttelsesmidler fjerner mange typer av beskyttelsesgrupper fra mange typer av funksjonelle grupper. For eksempel avbeskytter Birch-reduksjonsreaksjoner, ved anvendelse av væskeammoniakk og natrium (som beskrevet nedenfor) benzylgrupper fra tioler (eller mer spesielt svovel) eller karbamatgrupper fra nitrogen, men ikke acetatgrupper fra oksygen. Således kan et første avbeskyttelsesmiddel anvendes for å fjerne én type beskyttelsesgrupper, etterfulgt av anvendelse av et andre avbeskyttelsesmiddel for å fjerne en annen type beskyttelsesgrupper og så videre.

Fagpersoner på området vil være fortrolig en riktig rekkefølge av beskyttelsesgruppefjerning ved anvendelse av avbeskyttelsesmidler. *See e.g.*, Green og Wuts (1999). Ikke-begrensede eksempler på beskyttelsesgruppefjerning er beskrevet nedenfor.

5 Aminbeskyttelsesgrupper er velkjent for fagfolk på området. Se for eksempel Green og Wuts (1999), Kapittel 7. Disse beskyttelsesgrupper kan installeres via beskyttende midler velkjent for fagfolk på området. Fjerning av disse grupper er også velkjent for fagfolk på området.

I noen utførelsesformer kan amin-beskyttelsesgruppen velges fra gruppen
 10 bestående av *t*-butoksykarbonyl, benzyloksykarbonyl, formyl, trityl, acetyl, trikloracetyl, dikloracetyl, kloracetyl, trifluoracetyl, difluoracetyl, fluoracetyl, benzyklorformiat, 4-fenylbenzyloksykarbonyl, 2-metylbenzyloksykarbonyl, 4-etoksybenzyloksykarbonyl, 4-fluorbenzyloksykarbonyl, 4-klorbenzyloksykarbonyl, 3-klorbenzyloksykarbonyl, 2-klorbenzyloksykarbonyl, 2,4-diklorbenzyloksykarbonyl, 4-brombenzyloksykarbonyl, 3-brombenzyloksykarbonyl, 4-nitrobenzyloksykarbonyl, 4-cyanobenzyloksykarbonyl, 2-(4-xenyl)isopropoksykarbonyl, 1,1-difenylet-1-yloksykarbonyl, 1,1-difenylprop-1-yloksykarbonyl, 2-fenylprop-2-yloksykarbonyl, 2-(*p*-toluyl)prop-2-yloksykarbonyl, 15 syklopentanyloksykarbonyl, 1-metylcyklopentanyloksykarbonyl, sykloheksanyloksykarbonyl, 1-metylcykloheksanyloksykarbonyl, 2-metylcykloheksanyloksykarbonyl, 2-(4-toluylsulfonyl)etoksykarbonyl, 2-(metylsulfonyl)etoksykarbonyl, 2-(trifenylfosfino)etoksykarbonyl, fluorenylmetoksykarbonyl, 2-(trimetylsilyl)etoksykarbonyl, allyloksykarbonyl, 1-(trimetylsilylmetyl)prop-1-enyloksykarbonyl, 5-benzisoksalylmetoksykarbonyl, 4-acetoksybenzyloksykarbonyl, 2,2,2-trikloretoksykarbonyl, 2-etylnyl-2-propoksykarbonyl, 25 syklopropylmetoksykarbonyl, 4-(decyloksyl)benzyloksykarbonyl, isobomyloksykarbonyl, 1-piperidyloksykarbonyl og 9-fluorenylmetylkarbonat.

I noen utførelsesformer er beskyttelsesmidlet for aminbeskyttelse valgt fra gruppen bestående av benzyklorformiat, *p*-nitro-klorbenzylformat, etylklorformiat, di-tert-butyl-dikarbonat, trifenylmetylklorid og metoksytrifenylmetylklorid. I en foretrukket
 30 utførelsesform er beskyttelsesgruppen benzyloksykarbonyl, installert med beskyttelsesmidlet benzyloksyklorformiat.

Tiolbeskyttelsesgrupper er velkjent for fagfolk på området. Se for eksempel Green og Wuts (1999), Kapittel 6. Disse beskyttelsesgrupper kan være installert via beskyttende midler velkjent for fagfolk på området. Fjerning av disse grupper er også velkjent for fagfolk på området.

5 I noen utførelsesformer kan en tiolbeskyttelsesgruppe velges fra gruppen bestående av acetamidometyl, benzamidometyl, 1-etoksyetyl, benzoyl, trifenylmetyl, *t*-butyl, benzyl, adamantyl, cyanoetyl, acetyl og trifluoracetyl.

I noen utførelsesformer er det beskyttende middel for tiolbeskyttelse valgt fra gruppen bestående av et alkylhalogenid, et benzylhalogenid, et benzoylhalogenid, et 10 sulfonylhalogenid, et trifenylmetylhalogenid, et metoksytrifenylmetylhalogenid og cystein. Ikke-begrensede eksempler på disse beskyttende midler omfatter etylhalogenider, propylhalogenider og acetylhalogenider. Halogenider kan for eksempel omfatte klor, brom eller jod. I en foretrukket utførelsesform er beskyttelsesgruppen benzyl, installert ved det beskyttende middel benzylklorid.

15 Hydroksy (eller alkohol) beskyttelsesgrupper er velkjent for fagfolk på området. Se for eksempel Green og Wuts (1999), Kapittel 2. Disse beskyttelsesgrupper kan være installert via beskyttende midler velkjent for fagfolk på området. Fjerning av disse grupper er også velkjent for fagfolk på området.

En egnet hydroksybeskyttelsesgruppe kan velges fra gruppen bestående av estere 20 eller etere. Estere så som acetat, benzoyl, tert-butylkarbonyl og trifluoracetylgrupper er fjernbare ved sure eller basiske betingelser. Etere så som metoksy, etoksy og tri-benzylmetyl er fjernbare ved sterkere sure eller basiske betingelser. En foretrukket beskyttelsesgruppe er en acetatester.

Karbonylbeskyttelsesgrupper er velkjent for fagfolk på området. Se for eksempel 25 Grøen og Wuts (1999), Kapittel 4. Slike beskyttelsesgrupper kan beskytte, for eksempel ketoner eller aldehyder eller karbonylen til stede i estere, amider og estere. Disse beskyttelsesgrupper kan være installert via beskyttende midler velkjent for fagfolk på området. Fjerning av disse grupper er også velkjent for fagfolk på området.

I noen utførelsesformer kan en karbonylbeskyttelsesgruppe velges fra gruppen 30 bestående av dimetylacetal, dimetylketal, diisopropylacetal, diisopropylketal, enaminer og enoletere.

Karboksytsyrebeskyttelsesgrupper er velkjent for fagfolk på området. Se for eksempel Green og Wuts (1999), Kapittel 5. Fjerning av disse grupper er også velkjent for fagfolk på området.

5 En egnet karboksytsyrebeskyttelsesgruppe kan for eksempel velges fra gruppen bestående av amider eller estere. Amider så som sulfonamid, para-nitroanilin, benzylamid og benzolyamid kan hydrolyseres i sure betingelser. Estere så som metylester, etylester og benzylester kan muligens hydrolyseres ved sure eller basiske betingelser. En foretrukket beskyttelsesgruppe er et amid.

C. Metallioner

10 Som angitt ovenfor angår visse utførelsesformer av foreliggende oppfinnelse preparater som chelaterer én eller flere metallioner. De målsøkende ligander kan også delta i chelatering til én eller flere metallioner. Et "metallion" er her definert for å referere til et metallion som kan danne en binding, så som en ikke-kovalent binding, med én eller flere atomer eller molekyler. Det andre atom(er) eller molekyl(er) kan være negativt ladet.

15 Hvilket som helst metallion kjent for fagfolk på området er forutsett for innkludering i preparatene. En fagmann på området ville være fortrolig med metallionene og deres anvendelse(r). I noen utførelsesformer kan metallionet velges fra gruppen bestående av Tc-99m, Cu-60, Cu-61, Cu-62, Cu-67, I-111, Tl-201, Ga-67, Ga-68, As-72, Re-186, Re-187, Re-188, Ho-166, Y-90, Sm-153, Sr-89, Gd-157, Bi-212, Bi-213, Fe-56, 20 Mn-55, Lu-177, et jernion, et arsenion, et selenion, et talliumion, et manganion, et koboltion, et platinaion, et rheniumion, et kalsiumion og et rhodiumion. For eksempel kan metallionet være et radionuklid. Et radionuklid er en isotop med kunstig eller naturlig opprinnelse som oppviser radioaktivitet. I noen utførelsesformer er radionuklidet valgt fra gruppen bestående av ^{99m}Tc , ^{188}Re , ^{186}Re , ^{153}Sm , ^{166}Ho , ^{90}Y , ^{89}Sr , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{111}In , ^{148}Gd , 25 ^{55}Fe , ^{225}Ac , ^{212}Bi , ^{211}At , ^{45}Ti , ^{60}Cu , ^{61}Cu , ^{67}Cu og ^{64}Cu . I foretrukne utførelsesformer er metallionet rhenium eller et radionuklid så som ^{99m}Tc , ^{188}Re eller ^{68}Ga . Som beskrevet nedenfor kan det være nødvendig at et reduksjonsmiddel ledsager ett av radionuklidene, så som for ^{99m}Tc . Ikke-begrensede eksempler på slike reduksjonsmidler omfatter et ditioniteion, et tinnion og et jern(II)ion.

30 På grunn av bedre avbildningskarakteristika og lavere pris er forsøk gjort med å erstatte ^{123}I , ^{131}I , ^{67}Ga og ^{111}In merkede forbindelser med tilsvarende ^{99m}Tc merkede

forbindelser når mulig. På grunn av fordelaktige fysikalske karakteristika så vel som ekstremt lav pris (\$0,21/mCi), er ^{99m}Tc foretrukket for merking av radiofarmasøytika.

Flere faktorer må vurderes for optimal radioavbildning hos mennesker. For å maksimere effektiviteten av deteksjonen er et metallion som emitterer gammaenergi i 100 til 200 keV området foretrukket. En "gammaemitter" er her definert som et middel som emitterer gammaenergi i hvilket som helst område. En fagmann på området ville være fortrolig med de forskjellige metallioner som er gammaemittere. For å minimalisere den absorberte stråledose til pasienten bør den fysikalske halveringstiden til radionuklidet være som kort som avbildningsprosedyre tillater. For å tillate at undersøkelsen utføres på hvilken som helst dag og hvilken som helst tid på dagen er det fordelaktig å alltid ha en kilde for radionuklidet tilgjengelig på klinikken. ^{99m}Tc er et foretrukket radionuklid fordi det emitterer gammastråling ved 140 keV, den har en fysikalsk halveringstid på 6 timer og den er lett tilgjengelig på stedet ved anvendelse av en molybden-99/technesium- 99m generator. En fagmann på området ville være fortrolig med metoder for å bestemme optimal radioavbildning hos mennesker.

I visse spesielle utførelsesformer av foreliggende oppfinnelse er metallionet et terapeutisk metallion. I noen utførelsesformer er for eksempel metallionet et terapeutisk radionuklid som er en beta-emitter. Som her definert er en beta-emitter hvilket som helst middel som emitterer betaenergi i hvilket som helst område. Eksempler på beta-emittere omfatter Re-188, Re-187, Re-186, Ho-166, Y-90, Bi-212, Bi-213 og Sn-153. Beta-emitterne kan eller kan ikke også være gamma-emittere. En fagmann på området ville være fortrolig med anvendelse av beta-emittere ved behandling av hyperproliferativ sykdom, så som kreft.

I ytterligere utførelsesformer av preparatene er metallionet et terapeutisk metallion som ikke er en betaemitter eller en gamma emitter. For eksempel kan det terapeutiske metallion være platina, kobolt, kobber, arsen, selen, kalsium eller tallium. Preparater omfattende disse terapeutiske metallioner kan anvendes ved metoder rettet mot behandling av sykdommer så som hyperproliferative sykdommer, kardiovaskulær sykdom, infeksjoner og inflammasjon. Eksempler på hyperproliferative sykdommer omfatter kreft. Metoder for å utføre kombinert kjemoterapi og strålingsterapi som involverer preparatene er beskrevet mer detaljert nedenfor.

D. Målsøkende ligander

Et "målsøkende ligand" er definert her å være et molekyl eller del av et molekyl som binder med spesifisitet til et annet molekyl. Ifølge foreliggende oppfinnelse er den målsøkende ligand et middel som etterligner glukose.

5 Et enkelt målsøkende ligand eller flere enn ett slikt målsøkende ligand, kan være konjugert til en chelator. I disse utførelsesformer kan hvilket som helst antall målsøkende ligander være konjugert til chelatorene angitt her. I visse utførelsesformer kan et konjugat omfatte et enkelt målsøkende ligand. I andre utførelsesformer kan et konjugat omfatte kun
10 to målsøkende ligander. I ytterligere utførelsesformer kan et målsøkende ligand omfatte tre eller flere målsøkende ligander. I hvilken som helst situasjon hvor et konjugat omfatter to eller flere målsøkende ligander kan de målsøkende ligander være like eller forskjellige.

De målsøkende ligander kan være bundet til chelatoren på hvilken som helst måte, omfattende for eksempel kovalente bindinger, ioniske bindinger og hydrogenbindinger. For eksempel kan det målsøkende ligand være bundet til chelatoren ved en amidbinding,
15 en esterbinding eller en karbon-karbon binding av hvilken som helst lengde. Hvis to eller flere målsøkende ligander er bundet til en chelator kan bindingene være like eller forskjellige. I andre utførelsesformer omfatter bindingen en linker. Ikke-begrensede eksempler på slike linkere omfatter peptider, glutaminsyre, asparaginsyre, brometylacetat, etylendiamin, lysin og hvilken som helst kombinasjon av én eller flere av disse grupper.
20 En fagmann på området vil være fortrolig med kjemien for disse midlene og metoder til konjugering av disse midler som ligander til chelatorene i den krevde oppfinnelse. Metoder for syntese av forbindelsene, inklusive konjugeringsmetoder, er beskrevet i detalj nedenfor.

Informasjon om målsøkende ligander og konjugering med forbindelser er gitt i U.S.
25 Patent 6,692,724, U.S. Patentsøknad Serie nr. 09/599,152, U.S. Patentsøknad Serie nr. 10/627,763, U.S. Patentsøknad Serie nr. 10/672,142, U.S. Patentsøknad Serie nr. 10/703,405 og U.S. Patentsøknad Serie nr. 10/732,919.

Midler som etterligner glukose

Midler som etterligner glukose er forutsatt for inklusjon som målsøkende ligander. Slike midler kan også betraktes som “glukoseanaloger” eller “glukosderivater.”

5 Glukose anvendes av levende organismer gjennom glykolyse-mekanismen. Forbindelser så som neomycin, kanamycin, gentamycin, amikacin, tobramycin, netilmicin, ribostamycin, sisomicin, mikromicin, lividomycin, dibekacin, isepamicin og astromicin tilhører en gruppe betegnet som aminoglykosider.

Når det gjelder struktur har midler som etterligner glukose typisk en glukose ringstruktur. Unntak eksisterer imidlertid så som puromycin, som har en pentose ringstruktur, men som fortsatt kan betraktes som et middel som etterligner glukose.

Når det gjelder funksjon blir aminoglykosider anvendt som antibiotika som blokkerer glykolyse mekanismen gjennom deres egenskap å strukturelt etterligne glukose og således er de funksjonelt betraktet som midler som etterligner glukose. Når disse aminoglykosider blir anvendt i avbildningsundersøkelser er det ingen detekterbare farmakologiske effekter.

Ordet "etterligner", som definert av American Heritage Dictionary fjerde utgave, betyr "to resemble closely or simulate." Aminoglykosider anvendes funksjonelt gjennom den glykolytiske mekanisme i kraft av deres strukturelle likhet med glukose og blokkerer glykolysemekanismen. Således er aminoglykosider antatt å etterligne eller simulere glukose på en strukturell og funksjonell måte.

Ikke-begrensede eksempler på kjemiske strukturer med deres PubChem Database (NCBI) identifikator CID nummer er som følger: Amikacin CID 37768; Aminoglykosid CID 191574; Astromicin CID 65345; Deoksy-glukose CID 439268; D-glucosamin CID 441477; Dibekacin CID 3021; Gentamicin CID 3467; Glukose CID 5793; Isepamicin CID 456297; Kanamycin CID 5460349; Lividomycin CID 72394; Mikromicin CID 107677; Neomycin CID 504578; Netilmicin CID 441306; Puromycin CID 439530; Ribostamycin CID 33042; Sisomicin CID 36119; og Tobramycin CID 36294.

Referanser som beskriver glykolyseblokkering ved bruk av aminoglykosider omfatter for eksempel Tachibana *et al.*, 1976; Borodina *et al.*, 2005; Murakami *et al.*, 1996; Hoelscher *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2004; Michalik *et al.*, 1989; Murakami *et al.*, 1997; Diamond *et al.*, 1978; Hostetler og Hall, 1982; Benveniste og Davies, 1973; Hu,

1998; Yanai *et al.*, 2006; Myszka *et al.*, 2003; Nakae og Nakae, 1982; Ozmen *et al.*, 2005; og Tod *et al.*, 2000.

Foretrukne midler som etterligner glukose eller sukkere, omfatter neomycin, kanamycin, gentamycin, paromycin, amikacin, tobramycin, netilmicin, ribostamycin, sisomicin, mikromicin, lividomycin, dibekacin, isepamicin, astromicin og aminoglykosider glukose og glucosamin.

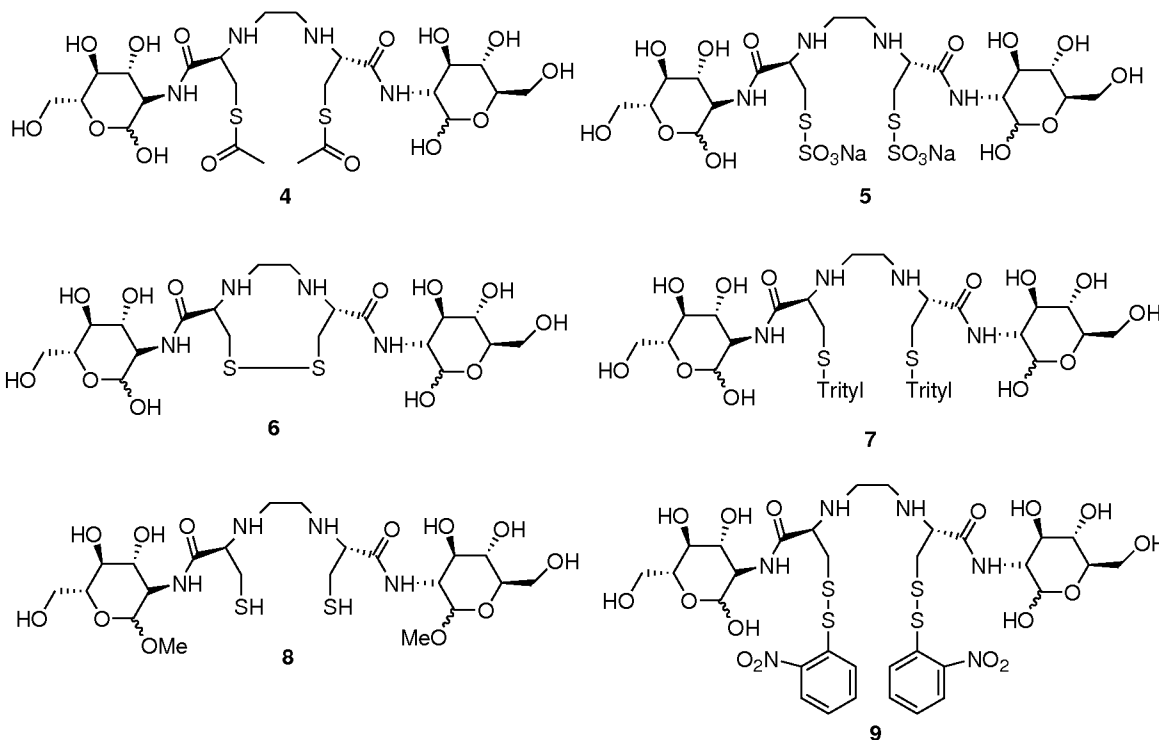
E. Syntesemetoder

1. Kilde for reagenser for preparatene

Reagenser for fremstilling av preparatene kan erverves fra hvilken som helst kilde. Et bredt område av kilder er kjent for fagfolk på området. For eksempel kan reagensene erverves fra kommersielle kilder så som Sigma-Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI), ved kjemisk syntese eller fra naturlige kilder. For eksempel er én leverandør av radionuklider Cambridge Isotop Laboratories (Andover, MA). Reagensene kan isoleres og renses ved anvendelse av hvilken som helst teknikk kjent for fagfolk på området, som beskrevet her. De frie ubundne metallioner kan fjernes med, for eksempel ionebytteharpiks eller ved tilsetning av en transchelator (f.eks. glucoheptonat, glukonat, glucarat eller acetylacetonat).

2. Anvendelse av et mellomprodukt som den aktive farmasøytiske bestanddel (API)

Disulfiddannelse og nukleofilt angrep på det anomeriske senter i glucosamingruppen kan for visse forbindelser være problematisk. Disse uønskede reaksjoner forekomme på tiol-grupper og/eller aminogruppene i EC-glucosamin (EC-G): disse er de viktigste bireaksjoner som kan forårsake ustabilitet av EC-G. Videre kan det typiske lave utbytte i avbeskyttelsestrinnet med Na/NH₃ for å gi det primære produkt EC-G føre til dårlig renhet (se FIG. 1 og 13). Følgelig kan det være ønskelig å anvende mellomprodukter i synteser ifølge foreliggende oppfinnelse som aktiv farmasøytiske bestanddeler (APIs). For eksempel kan EC-G analoger så som de vist nedenfor, som er mellomprodukter i visse fremstillinger anvendes som APIer. Disse analoger kan i visse utførelsesformer gi høy renhet ved oppskalering.



3. Renseprosedyrer og bestemmelser av renhet

Som nevnt ovenfor vil fagpersoner på området være fortrolig med metoder for rensning av forbindelser. Som anvendt her angir “rensning” hvilken som helst målbar økning i renhet i forhold til renheten av materialet før rensning. Rensning av hver forbindelse er generelt mulig, omfattende rensingen av mellomprodukter så vel som rensning av sluttprodukteter. Rensetrinnet er ikke alltid omfattet i de generelle metoder forklart nedenfor, men en fagmann på området vil forstå at forbindelser generelt kan renses på hvilket som helst trinn. Eksempler på rensemetoder omfatter gelfiltrering, størrelses ekskluderingskromatografi (også betegnet gelfiltrering kromatografi, gel permeasjonskromatografi eller molekylær eksklusjon), dialyse, destillering, omkrystallisering, sublimering, derivatisering, elektroforese, silikagel kolonnekromatografi og høy-ytelse væskechromatografi (HPLC), omfattende normal-fase HPLC og omvendt-fase HPLC. I visse utførelsesformer er størrelses ekskluderingskromatografi og/eller dialyse spesifikt utelukket som rensemetoder for forbindelser. Rensning av forbindelser for eksempel via silikagel-kolonne kromatografi eller HPLC, gir fordelen av å gi ønske forbindelser i meget høy renhet, ofte høyere enn når forbindelser blir renses ved andre metoder. Radiokjemisk renhet av forbindelser kan også bestemmes. Metoder for bestemmelse av radiokjemisk renhet er velkjent på området og omfatter kromatografisk

metoder sammen med radioaktivitetsdeteksjonsmetoder (*e.g.*, autoradiografianalyser). Eksempler på sammenligninger av renhet av forbindelser gjort via organiske- og våte metoder og renses ved varierende metoder er gitt nedenfor.

Metoder for bestemmelse av renheten av forbindelser er velkjent for fagfolk på
5 området og omfatter, i ikke-begrensede eksempler, autoradiografi, massespektroskopi, smeltepunktbestemmelse, ultrafilolett analyse, kolorimetrisk analyse, (HPLC),
tynnskikt-kromatografi og kjernemagnetisk resonans (NMR) analyse (omfattende, men ikke begrenset til, ^1H og ^{13}C NMR). I noen utførelsesformer kan en kolorimetrisk metode
10 anvendes for titrering av renheten til en chelator eller et chelator-målsøkende ligandkonjugat. For eksempel kan dannelse av et tiol-benzyl-addukt (dvs. en tiol funksjonell gruppe beskyttet med en benzylgruppe) eller ytelsen ved en oksidasjonsreaksjon ved anvendelse av jod, anvendes for å bestemme renheten av chelatoren eller et chelator-målsøkende ligandkonjugat. I én utførelsesform kan renheten av en ukjent forbindelse bestemmes ved å sammenligne det med en forbindelse med kjent
15 renhet: denne sammenligning kan være i form av et forhold hvis måling beskriver renheten av den ukjente komponent. Programvare tilgjengelig på varierende instrumenter (*e.g.*, spektrofotometere, HPLC, NMR) kan hjelpe en fagmann på området som gjør disse bestemmelser, samt andre metoder kjent for fagfolk på området.

De følgende parametere kan anvendes, i visse utførelsesformer, for å bestemme
20 renheten av forbindelser:

Kolonne: Primesep100, 4,6 x 150 mm, 5 μm , omgivelsestemperatur

Mobil fase (A): H_2O med 0,025% TFA

Mobil fase (B): acetonitril med 0,025% TFA

Isokratisk kjørt: A/B (50/50) ved 1,0 ml/min

25 Deteksjon: ELSD, SEDEX75, 50C, 4,5 bar

I visse utførelsesformer av foreliggende oppfinnelse vil rensning av en forbindelse ikke fjerne alle urenheter. I noen utførelsesformer kan slike urenheter identifiseres.

4. Fremstilling av chelator

Metoder for fremstilling og dannelselse av chelatorer er velkjent for fagfolk på området. For eksempel kan chelatorer oppnås fra kommersielle kilder, kjemisk syntese eller naturlige kilder.

5 I én utførelsesform kan chelatoren omfatte etylendicystein (EC). Fremstilling av etylendicystein (EC) er beskrevet i U.S. Patent nr. 6,692,724. Kort kan EC fremstilles i en to-trinns syntese i henhold til de tidligere beskrevne metoder (Ratner og Clarke, 1937; Blondeau et al., 1967). Forløperen, L-tiazolidin-4-karboksylysyre, ble syntetisert og deretter ble EC deretter fremstilt. Det er ofte også viktig å inkludere en antioksidant i 10 preparatet for å forhindre oksidasjon av etylendicystein. Den foretrukne antioksidant for anvendelse sammen med foreliggende oppfinnelse er vitamin C (askorbinsyre). Det er imidlertid antatt at andre antioksidanter, så som tokoferol, pyridoxin, tiamin eller rutin også kan være anvendelige.

Chelatorer kan også omfatte aminosyrer bundet sammen avstandsstykker. Slike 15 avstandsstykker kan omfatte, som beskrevet ovenfor, et alkyl avstandsstykke så som etylen.

Amidbindinger kan også forbinde en eller flere aminosyrer for å danne en chelator. Eksempler på syntese-metoder for fremstilling av slike chelatorer omfatter fastfase-syntese og løsnings-fase syntese. Slike metoder er beskrevet, for eksempel i Bodansky, 1993 og 20 Grant, 1992.

5. Organisk syntese av chelator-målsøkende ligandkonjugater

I en foretrukket utførelsesform tilveiebringer foreliggende oppfinnelse videre en metode for organisk syntetise av chelator-målsøkende ligandkonjugater. Metoden omfatter tilveiebringelse av for eksempel en chelator så som etylendicystein (EC) som 25 beskrevet ovenfor og blanding av EC med en tiol-beskyttelsesgruppe i et organisk medium for å beskytte begge de frie tioler, hvilket resulterer i en S-S'-bis-beskyttet-EC, som deretter blir blandet med en amino-beskyttelsesgruppe i et organisk/vandig medium for å beskytte begge de frie aminer, hvilket resulterer i en S-S'-bis-beskyttet-N,N'-bis-beskyttet-EC. Tiol-grupper er mer reaktiv enn nitrogen-grupper; således beskyttes tiol-grupper typisk først. Som beskrevet ovenfor vil fagpersoner på området være fortrolig med den 30 riktige rekkefølgen for installasjon av beskyttelsesgrupper avhengig av de ulike typer av

funksjonelle grupper til stede på chelatoren. Den beskyttede EC blir deretter konjugert til et målsøkende ligand av hvilken som helst type beskrevet her via hvilken som helst metode for konjugering beskrevet her fulgt av fjerning av tiol- og amino-beskyttelsesgrupper, som resulterer i et chelator-målsøkende ligandkonjugat.

5 I visse utførelsesformer finner konjugering mellom en chelator og et målsøkende ligand sted i ett trinn. I spesielle utførelsesformer omfatter konjugeringen en kovalent binding på en chelator til et målsøkende ligand, hvor den kovalent bindingen oppstår i ett trinn. Som nevnt er slike ett-trinns prosedyrer foretrukne da de minimaliser tidsbruken, reagenser, avfall og tap av produkt.

10 Chelator-målsøkende ligandkonjugater syntetisert ved denne metoden kan videre være chelatert til et metallion av hvilken som helst type beskrevet her. Slike metoder for chelatering er velkjent for fagfolk på området og er beskrevet her. Eksempler på metoder for chelatering av metallioner til chelator-målsøkende ligandkonjugater er beskrevet, for eksempel i U.S. Patent nr. 6,692,724. Metoder beskrevet her hvor et metallion er chelatert
15 til en chelator kan også tjene som eksempler på hvordan chelatere et metallion til et chelator-målsøkende ligandkonjugat.

Fordelene ved syntese av chelator-målsøkende ligandkonjugater via metodene ifølge foreliggende oppfinnelse ved anvendelse av organisk syntese omfatter for eksempel frembringelse av konjugater med høy renhet i forhold til konjugater oppnådd via vandig
20 syntese og effektiv syntese og rensning av små-molekylforbindelser (*e.g.*, 1000 g/mol eller mindre). Disse fordelene tillater konjugater som kan anvendes i avbildning, diagnostiske og/eller terapeutiske forsøk og/eller kliniske forsøk.

6. Organisk syntese av chelator-målsøkende ligandkonjugater chelatert til et metallion

25 I en annen foretrukket utførelsesform tilveiebringer foreliggende oppfinnelse videre en metode for organisk syntese av chelator-målsøkende ligandkonjugater chelatert til et metallion for avbildning, diagnostisk eller terapeutisk anvendelse. Metoden omfatter for eksempel først tilveiebringelse av en chelator, så som EC. EC kan deretter blandes med et metallion, som kan være et radionuklid eller hvilken som helst annet metallion som
30 beskrevet her, i et organisk medium for å chelatere til EC via et N₂S₂ chelat. *Se, e.g.*, FIG. 2. Andre metoder for chelatering er beskrevet her (*e.g.*, chelater av hvilken som helst

kombinasjon av O, N og S) og chelatering kan forekomme ved hvilken som helst metode beskrevet her. I ikke-begrensede eksempler kan metaller så som technesium, indium, rhenium, gallium, kobber, holmium, platina, gadolinium, lutecium, yttrium, kobolt, kalsium og arsen være chelatert med en chelator så som EC. EC chelatert til et metallion
5 ("chelatert EC") blir deretter blandet med et målsøkende ligand, eventuelt beskyttet med én eller flere beskyttelsesgrupper, i nærvær av et organisk medium for å generere et chelator-målsøkende ligandkonjugat chelatert til et metallion. Konjugeringsmetoder kan være via hvilken som helst metode beskrevet her og kan skje i ett trinn eller i flere enn ett trinn.

Fordelene ved syntese av metallion-merkede chelator-målsøkende ligandkonjugater
10 via metodene ifølge foreliggende oppfinnelse ved anvendelse av organisk syntese omfatter for eksempel tilveiebringelse av konjugater med høy renhet i forhold til konjugater oppnådd via vandig syntese og effektiv syntese og rensning av små-molekylforbindelser (e.g., 1000 g/mol eller mindre). Disse fordelene gir konjugater som kan anvendes i avbildning, diagnostiske og/eller terapeutiske forsøk og/eller kliniske forsøk.

15 **7. Vandig syntese av chelator-målsøkende ligandkonjugater**

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer videre en metode for syntese av chelator-målsøkende ligandkonjugater i et vandig medium. Chelator-målsøkende ligandkonjugater ble generelt fremstilt som en metode for sammenligning av den relative renhet av slike eller lignende produkter når syntetisert i organisk medium. Metoden omfatter for
20 eksempel først tilveiebringelse av en chelator, så som EC. EC blir deretter oppløst i en basisk vandig løsning og koblingsmidler av hvilken som helst type beskrevet her blir tilsatt. Det målsøkende ligand blir deretter satt til denne løsningen for å danne chelator-målsøkende ligandkonjugat.

25 **8. Vandig syntese av chelator-målsøkende ligandkonjugater chelatert til et metallion**

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer videre en metode for syntese av, i et vandig medium, chelator-målsøkende ligandkonjugater chelatert til et metallion. Som for den vandige syntese nevnt ovenfor ble chelator-målsøkende ligandkonjugater chelatert til et metallion fremstilt som en metode for sammenligning av den relative renhet av slike eller
30 lignende produkter når syntetisert i organisk medium. Metoden begynner, i én utførelsesform, med tilveiebringelse av en chelator chelatert til et metallion som beskrevet

ovenfor (“Organisk syntese av chelator–målsøkende ligandkonjugater chelatert til et metallion”). Denne chelator chelatert til et metallion kan for eksempel være chelatert EC som beskrevet ovenfor. Chelatering kan forekomme ved hvilken som helst metode beskrevet her. Chelatert EC kan oppløses i en basisk vandig løsning og koblingsmidler, som beskrevet her, blir tilsatt sammen med et målsøkende ligand av hvilken som helst type beskrevet her for å generere et chelator–målsøkende ligandkonjugat chelatert til et metallion.

9. Konjugering av en chelator med en målsøkende ligand

Foreliggende oppfinnelse forutsetter metoder for konjugering av en målsøkende ligand til en chelator (eventuelt chelatert til et metallion). Det målsøkende ligand kan være av hvilken som helst type beskrevet her. En fagmann på området vil være fortrolig med metodene for konjugering av målsøkende ligander til forskjellige funksjonelle grupper. Mest vanlig, som mellom chelatoren og det målsøkende ligand, virker én som nukleofil og én virker som elektrofil slik at konjugering finner sted via en kovalent binding. Ikke-begrensede eksempler på slike kovalent bindinger omfatter en amidbinding, en esterbinding, en tioesterbinding og en karbon-karbon binding. I foretrukne utførelsesformer finner konjugeringen sted via en amid- eller esterbinding. I noen utførelsesformer finner konjugeringen sted på én eller flere funksjonelle grupper av chelatoren valgt fra gruppen bestående av karboksylsyre, amin og tiol. Når de virker som elektrofiler kan chelatorer og målsøkende ligander omfatte funksjonelle grupper så som halogenatomer og sulfonyler som virker som utgående grupper under konjugeringen. Målsøkende ligander kan også omfatte nukleofile grupper, så som $-NH_2$, som kan delta i konjugering med en elektrofil chelator.

Koblingsmidler, som anvendt her, er reagenser anvendt for å lette koblingen av en chelator til et målsøkende ligand. Slike midler er velkjent for fagfolk på området og kan anvendes i visse utførelsesformer av metodene ifølge foreliggende oppfinnelse. Eksempler på koblingsmidler omfatter, men er ikke begrenset til, sulfo-N-hydroksysuccinimid (sulfo-NHS), dimetylamino­pyridin (DMAP), diazabicyklo[5.4.0]undec-7-en (DBU), 1-etyl-3-(3-dimetylamino­propyl) karbodiimid (EDAC) og dicykloheksylkarbodiimid (DCC). Andre karbodiimider er også forutsett som koblingsmidler. Koblingsmidler er beskrevet, for eksempel i Bodansky, 1993 og Grant, 1992. Disse koblingsmidler kan anvendes allene eller i kombinasjon med hverandre eller andre midler for å lette konjugering. Når det

målsøkende ligand er konjugert ved anvendelse av et koblingsmiddel dannes typisk urinstoff. Urinstoffbiprodukt kan fjernes ved filtrering. Det konjugerte produkt kan deretter renses ved for eksempel silikagel kolonnekromatografi eller HPLC.

5 Generelt vil ligandene for anvendelse sammen med foreliggende oppfinnelse ha funksjonelle grupper som kan konjugere til én eller flere funksjonelle grupper på en chelator, så som EC. For eksempel kan et målsøkende ligand ha en halogenert stilling som vil reagere med et fritt amin på en chelator for å danne konjugatet. Hvis funksjonelle grupper ikke er tilgjengelig eller hvis en optimal funksjonell gruppe ikke er tilgjengelig kan en ønsket ligand fortsatt konjugeres til en chelator, så som EC, ved tilsetning av en linker, så som etylendiamin, aminopropanol, dietyltriemin, asparaginsyre, polyasparaginsyre, glutaminsyre, polyglutaminsyre, cystein, glycin eller lysin. For eksempel beskriver U.S. Patent 6,737,247 mange linkere som kan anvendes med foreliggende. U.S. Patent 5,605,672 beskriver mange “foretrukne skjelettstrukturer” som kan anvendes som linkere i foreliggende oppfinnelse. I visse utførelsesformer kan chelatoren være konjugert til en linker og bindingene er konjugert til det målsøkende ligand. I andre utførelsesformer kan flere enn én linker anvendes; for eksempel kan en chelator være konjugert til en linker og bindingene er konjugert til en andre linker, hvor den andre linker er konjugert til det målsøkende ligand. I visse utførelsesformer kan to, tre, fire eller flere linkere som er konjugert sammen anvendes for å konjugere en chelator og målsøkende ligand. Det er imidlertid generelt foretrukket å kun anvende en enkel linker til konjugering av en chelator og et målsøkende ligand.

Noen chelatorer, så som EC, er vannoppløselig. I noen utførelsesformer er det chelator-målsøkende ligandkonjugat chelatert til et metallion ifølge oppfinnelsen vannoppløselig. Mange av de målsøkende ligander anvendt sammen med foreliggende oppfinnelse vil være vannoppløselig eller vil danne en vannoppløselig forbindelse når konjugert til chelatoren. Hvis det målsøkende ligand ikke er vannoppløselig vil imidlertid en linker som øker oppløseligheten av liganden kunne anvendes. Linkere kan knyttes til, for eksempel en alifatisk eller aromatisk alkohol, amin, peptid eller til en karboksylsyre. Linkere kan for eksempel være enten polyaminosyrer (peptider) eller aminosyrer så som glutaminsyre, asparaginsyre eller lysin. Tabell 2 illustrerer foretrukne linkere for spesifikke funksjonelle grupper i medikamenter.

Fordeler ved syntese av chelator-målsøkende ligandkonjugater eventuelt chelatert til én eller flere valent metallioner via metodene ifølge foreliggende oppfinnelse ved anvendelse av organisk syntese omfatter for eksempel tilveiebringelse av konjugater av høy renhet i forhold til konjugater oppnådd via vandig syntese og effektiv syntese og 5 rensning av små-molekylforbindelser (*e.g.*, 1000 g/mol eller mindre). Disse fordeler gir konjugater som kan anvendes i avbildning, diagnostiske og/eller terapeutiske forsøk og/eller kliniske forsøk.

TABELL 2

Linkere

Funksjonelle grupper i medikament	Linker	Eksempel
Alifatisk eller fenolisk-OH	EC-poly(glutaminsyre) (MW 750-15,000) eller EC poly(asparaginsyre) (MW 2000-15,000) eller brometylacetat eller EC-glutaminsyre eller EC-asparaginsyre.	østradiol, topotecan, paclitaxel, raloxifen etoposid
Alifatisk eller aromatisk-NH ₂ eller peptid	EC-poly(glutaminsyre) (MW 750-15,000) eller EC-poly(asparaginsyre) (MW 2000-15,000) eller EC-glutaminsyre (mono- eller diester) eller EC-asparaginsyre.	doxorubicin, mitomycin C, endostatin, annexin V, LHRH, oktreotid, VIP
Karboksytsyre eller peptid	Etylendiamin, lysin	metotrexat, folinsyre

10. Chelatering av et metallion

5 Foreliggende oppfinnelse omfatter videre metoder for chelatering (også betegnet koordinering) av ett eller flere metallioner til en chelator eller et chelator-målsøkende ligandkonjugat. Slike chelateringstrinn kan skje i organiske media. I andre utførelsesformer finner chelatering sted i vandige media. I visse utførelsesformer kan chelatoren og det målsøkende ligand begge bidra til chelatering av metallionet. I foretrukne utførelsesformer er metallionet kun chelatert til chelatoren. Det chelaterte metall on kan være bundet via for eksempel en ionisk binding, en kovalent binding eller en koordinert kovalent binding (også betegnet som en dativ binding). Metoder for slik

10

koordinering er velkjent for fagfolk på området. I én utførelsesform kan koordinering forekomme ved å blande et metallion inn i en løsning inneholdende en chelator. I en annen utførelsesform kan koordinering forekomme ved å blande et metallion inn i en løsning inneholdende et chelator-målsøkende ligandkonjugat. I én utførelsesform forekommer 5 chelatering til chelatoren, med eller uten et målsøkende ligand, via et N_2S_2 chelat dannet på chelatoren, så som etylendicystein (EC). Chelatorewn og det målsøkende ligand kan hver være beskyttet med én eller flere beskyttelsesgrupper før eller etter chelatering med metallionet.

Chelatering kan forekomme på hvilket som helst atom eller funksjonell gruppe med 10 en chelator eller målsøkende ligand som er tilgjengelig for chelatering. Chelateringen kan for eksempel skje på én eller flere N, S, O eller P atomer. Ikke-begrensede eksempler på chelaterende grupper omfatter NS_2 , N_2S , S_4 , N_2S_2 , N_3S og NS_3 og O_4 . I foretrukne utførelsesformer er et metallion chelatert til tre eller fire atomer. I noen utførelsesformer forekommer chelateringen blant én eller flere tioler, aminer eller karboksylsyre 15 funksjonelle grupper. Chelateringen i spesielle utførelsesformer, kan være til en karboksylgruppe med glutamat, aspartat, en analog av glutamat eller en analog av aspartat. Disse utførelsesformer kan omfatte multiple metallioner chelatert til poly(glutamat) eller poly(aspartat) chelatorer. I noen utførelsesformer er chelateringen av metallionet til et 20 målsøkende ligand, slik som til karboksylgrupper av en vev-spesifikk ligand. I foretrukne utførelsesformer er chelateringen mellom én eller flere tiolgrupper og én eller flere amin grupper på chelatoren.

I noen ikke-begrensede eksempler kan metallionet være technesium, indium, rhenium, gallium, kobber, holmium, platina, gadolinium, lutecium, yttrium, kobolt, kalsium, arsenic eller hvilken som helst isotop derav. Hvilke som helst metallion 25 beskrevet her kan være chelatert til en forbindelse ifølge foreliggende oppfinnelse.

11. Reduksjonsmidler

For formål ifølge foreliggende oppfinnelse, når metallionet er technesium, er det foretrukket at Tc er i +4 oksidasjonstrinn. Det foretrukne reduksjonsmiddel for denne anvendelse er tinnioner i form av tinnklorid ($SnCl_2$) å redusere Tc til dens +4 30 oksidasjonstrinn. Det er imidlertid antatt at andre reduksjonsmidler, så som ditionation eller jern(II)ion kan være anvendelige sammen med foreliggende oppfinnelse. Det er også antatt at reduksjonsmidlet kan være et fastfase reduksjonsmiddel. Mengden av

reduksjonsmiddel kan være viktig fordi det er nødvendig å unngå dannelsen av et kolloid. Det er for eksempel foretrukket å anvende fra ca. 10 til ca. 100 μg SnCl_2 pr. ca. 100 til ca. 300 mCi av Tc pertechnetat. Den mest foretrukne mengde er ca. 0,1 mg SnCl_2 pr. ca. 200 mCi av Tc pertechnetat og ca. 2 ml saltløsning. Dette gir typisk nok Tc-EC-målsøkende ligand konjugat for anvendelse i 5 pasienter.

F. Eksempler på avbildningsmodaliteter

1. Gammakamera avbildning

En rekke nukleærmedisinteknikker for avbildning er kjent for fagfolk på området. Hvilken som helst av disse teknikker kan anvendes i sammenheng med avbildningsmetoder ifølge foreliggende oppfinnelse for å måle et signal fra reporteren. For eksempel er gamma kameraavbildning forutsett som en metode for avbildning som kan anvendes for å måle et signal avledet fra reporteren. En fagmann på området ville være fortrolig med teknikker for anvendelse av gammakamera-avbildning (se *e.g.*, Kundra *et al.*, 2002). I én utførelsesform kan måling av et signal involvere anvendelse av gamma-kamera avbildning av et ^{111}I -oktreotid-SSRT2A reporter system.

2. PET og SPECT

Radionuklid avbildningsmodaliteter (positron-emisjonstomografi (PET); enkelt foton emisjon beregnings tomografi (SPECT)) er diagnostiske kryss-snitt avbildningsteknikker som kartlegger lokaliseringen og konsentrasjon av radionuklid-merkede radiotracere. Selv om CT og MRI gir betraktelig anatomisk informasjon om lokaliseringen og omfanget av tumorer, kan disse avbildningsmodaliteter ikke differensiere tilstrekkelig mellom invasive lesjoner fra ødem, strålings nekrose, ”grading” eller gliose. PET og SPECT kan anvendes for å lokalisere og karakterisere tumorer ved å måle metabolsk aktivitet.

PET og SPECT gir informasjon på cellulært nivå, så som cellulær levedyktighet. I PET inntar eller injiserer en pasient en lett radioaktiv substans som emitterer positroner som kan overvåkes etter hvert som substansen beveger seg igjennom kroppen. I for eksempel én vanlig utførelsesform gis pasienten en gitt glukose med tilknyttede positron-emittere og deres hjerner overvåkes etterhvert som de utfører ulioke oppgaver. Siden hjernen anvender glukose under arbeid viser et PET bilde hvor hjerneaktiviteten er høy.

Nær relatert til PET er enkelt-foton emisjon beregnings tomografi eller SPECT. Hovedforskjellen mellom de to er at istedenfor en positron-emitterende substans anvender SPECT en radioaktiv tracer som emitterer lav-energi fotoner. SPECT er verdifull for diagnose av koronararterie sykdom og omtrent 2,5 million SPECT hjerteundersøkelser blir allerede utført i USA hvert år.

PET radiofarmasøytiske midler for avbildning er normalt merket med positron-emittere så som ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{18}F , ^{82}Rb , ^{62}Cu og ^{68}Ga . SPECT radiofarmasøytiske midler er normalt merket med positronemittere så som ^{99m}Tc , ^{201}Tl og ^{67}Ga . Anvendt til hjerne avbildning er PET og SPECT radiofarmasøytiske midler klassifisert i henhold til blod-hjerne-barriere permeabilitet (BBB), cerebral perfusjon og metabolisme reseptor-binding og antigen-antistoff binding (Saha *et al.*, 1994). Blod-hjerne-barriere SPECT midler, så som $^{99m}\text{TcO}_4\text{-DTPA}$, ^{201}Tl og ^{67}Ga citrat ekskluderes av normale hjerneceller, men går inn i tumorceller på grunn av endret BBB. SPECT perfusjonsmidler så som ^{123}I IMP, ^{99m}Tc HMPAO, ^{99m}Tc ECD er lipofile midler og diffunderer derfor inn i den normale hjernen. Viktige reseptor-bindings SPECT radiofarmasøytiske midler omfatter ^{123}I QNE, ^{123}I IBZM og ^{123}I iomazenil. Disse tracere binder til spesifikke reseptorer og er av betydning i evalueringen av reseptor-beslektede sykdommer.

3. Datastyrt tomografi (CT)

Datastyrt tomografi (CT) er forutsett som en avbildningsmodalitet i sammenheng med foreliggende oppfinnelse. Ved å oppta en serie av røntgenbilder, noen ganger mer enn tusen, fra forskjellige vinkler og deretter kombinere disse ved hjelp av en datamaskin har CT gjort det mulig å bygge opp et tre-dimensjonalt bilde av hvilken som helst del av kroppen. En datamaskin er programmert for å nvisse to-dimensjonale skiver fra hvilken som helst vinkel og på hvilken som helst dybde.

I CT kan intravenøs injeksjon av et ikke gjennomtrengende kontrastmiddel ("radiopaque") assistere i identifisering og avgrensning av mykvevsmasser når innledende CT skan ikke er diagnostisk. Tilsvarende kan kontrastmidler være til hjelp ved evaluering av vaskulariteten til mykvev- eller benlesjoner. For eksempel kan anvendelse av kontrastmidler hjelpe til ved avgrensning av en tumor og i nabostilling vaskulære strukturer.

CT kontrastmidler omfatter for eksempel iodinerne kontrastmidler. Eksempler på disse midler omfatter iohalamat, ioheksol, diatrizoat, iopamidol, ethjodl og iopanoat. Gadolinium-midler har også vært angitt å være anvendelig som et CT kontrastmiddel (se *e.g.*, Henson *et al.*, 2004). For eksempel har gadopentat-midler vært anvendt som et CT
5 kkontrastmiddel (beskrevet i Strunk og Schild, 2004).

4. Magnetisk Resonans Avbildning (MRI)

Magnetisk resonans avbildning (MRI) er en avbildningsmodalitet som er nyere enn CT og som anvender en høy-styrke magnet og radio-frekvens-signaler for å produsere bilder. De rikeligste molekylære specier i biologisk vev er vann. Det er det
10 kvantemekaniske "spin" til vannprotonkjernene som til slutt gir opphav til signalet i avbildningsforsøk. I MRI blir prøven som skal avbildes plassert i en sterkt statisk magnetfelt (1-12 Tesla) og spinnene eksiteres med en puls med radiofrekvens (RF) stråling for å produsere en netto magnetisering i prøven. Ulike magnetiske feltgradienter og andre RF pulser virker deretter på og gir romlig informasjon i de registrerte signaler. Ved
15 oppsamling og analyse av disse signaler er det mulig å beregne et tre-dimensjonalt bilde som, i likhet med et CT bilde normalt vises i to-dimensjonale skiver.

Kontrastmidler anvendt i MR avbildning skiller seg fra de anvendt i andre avbildningsteknikker. Deres formål er å hjelpe med å skille mellom vevkomponenter med identiske signalkarakteristika og å korte ned på relaksasjonstidene (som vil produsere et
20 sterkere signal på T1-vektet spin-echo MR bilder og et mindre intenst signal på T2-vektede bilder). Eksempler på MRI kontrastmidler omfatter gadolinium-chelater, mangan-chelater, krom-chelater og jern partikler.

Både CT og MRI gir anatomisk informasjon som hjelper til med å skille vevgrenser og vaskulære strukturer. Sammenlignet med CT omfatter ulempene med MRI lavere
25 pasienttoleranse, kontraindikasjoner i pacemakere og visse andre implanterte metalliske anordninger og artefakter relatert til multiple årsaker, ikke minst bevegelse (Alberico *et al.*, 2004). CT er på den annen side rask godt tolerert og lett tilgjengelig, men har en lavere kontrastoppløsning enn MRI og krever iodinerne kontrast og ioniserende stråling (Alberico *et al.*, 2004). En ulempe med både CT og MRI er at ingen av disse avbildningsmodaliteter
30 tilveiebringer funksjonell informasjon på cellulært nivå. For eksempel tilveiebringer ingen av disse modaliteter informasjon angående cellulær levedyktighet.

5. Optisk Avbildning

Optisk avbildning er en annen avbildningsmodalitet som har oppnådd utstrakt aksept spesielt innenfor medisin. Eksempler omfatter optisk merking av cellulære komponenter og angiografi så som fluorescein-angiografi og indocyanin-grønn angiografi. Eksempler på optisk avbildningsmidler omfatter for eksempel fluorescein, fluorescein derivater, indocyanin-grønn, Oregon grønn, Oregon grønn derivat, rhodamin grønn, et derivat av rhodamin grønn, et eosin, et erythrosin, Texas rød, et derivat av Texas rød, malakitt grønn, nanogull sulfosuccinimidylester, kaskade blå, et kumarin derivat, et naftalen, et pyridyloksazolderivat, kaskade gult fargestoff eller dapoksyyl fargestoff.

6. Ultralyd

En annen biomedisinsk avbildningsmodalitet som har oppnådd utstrakt aksept er ultralyd. Ultralydabildning har vært anvendt ikkeinntrengende for å gi sanntid kryss-seksjonell og også tre-dimensjonale bilder av mykvevstrukturer og blodstrøminformasjon i kroppen. Høy-frekvente lydbølger og en datamaskin gir bilder av blodkar, vev og organer.

Ultralydabildning av blodstrøm kan være begrenset av flere faktorer så som størrelse og dybde av blodkarene. Ultralyd kontrastmidler, en relativt nyere utvikling, omfatter perfluor og perfluoranaloger, som er utformet å overvinne disse begrensninger ved å hjelpe til med å forbedre grå-skala bilder og Doppler signaler.

7. Prosedyre for dobbelt avbildning

Visse utførelsesformer av foreliggende oppfinnelse angår metoder for avbildning av et område hos et individ ved anvendelse av to avbildningsmodaliteter som involverer måling av et første signal og et andre signal fra avbildningsgruppe-chelator–metallion komplekset. Det første signal er avledet fra metallionet og den andre signal er avledet fra avbildningsgruppen. Som angitt ovenfor kan hvilken som helst avbildningsmodalitet kjent for fagfolk på området anvendes i disse utførelsesformer av foreliggende avbildningsmetoder.

Avbildningsmodalitetene blir utført på hvilket som helst tidspunkt under eller etter administrering av preparatet omfattende en diagnostisk effektiv mengde av preparatet ifølge foreliggende oppfinnelse. For eksempel kan avbildningsundersøkelser utføres under administrering av et dobbelt avbildningspreparat ifølge foreliggende oppfinnelse eller på

hvilket som helst tidspunkt deretter. I noen utførelsesformer blir den første avbildningsmodalitet utført begynnende samtidig med administrering av det doble avbildningsmidlet eller ca. 1 sek, 1 time, 1 dag eller hvilket som helst lenger tidsperiode etter administrering av det doble avbildningsmidlet eller på hvilken som helst tid i mellom
5 hvilket som helst av disse angitte tidspunkter.

Den andre avbildningsmodalitet kan utføres samtidig med den første avbildningsmodalitet eller på hvilken som helst tid etterfølgende den første avbildningsmodalitet. For eksempel kan den andre avbildningsmodalitet utføres ca. 1 sek, ca. 1 time, ca. 1 dag eller på hvilken som helst lenger tidsperiode etterfølgende fullføring
10 av den første avbildningsmodalitet eller på hvilken som helst tid mellom hvilken som helst av disse angitte tidspunkter. I visse utførelsesformer av foreliggende oppfinnelse blir den første og andre avbildningsmodalitet utført samtidig slik at de begynner samtidig etter administrering av midlet. En fagmann på området ville være fortrolig med ytelsen til de forskjellige avbildningsmodaliteter omfattet av foreliggende oppfinnelse.

I noen utførelsesformer av foreliggende metoder for dobbelt avbildning blir samme avbildningsanordning anvendt å utføre en første avbildningsmodalitet og en andre avbildningsmodalitet. I andre utførelsesformer blir forskjellige avbildningsanordning anvendt å utføre den andre avbildningsmodalitet. En fagmann på området ville være fortrolig med avbildningsanordninger som er tilgjengelig for utførelse av en første
15 avbildning og en andre avbildning og fagfolk ville være fortrolig med anvendelse av disse anordninger for å danne bilder.

G. Radioaktivt merkede midler

Som angitt ovenfor omfatter visse utførelsesformer av preparatene ifølge foreliggende oppfinnelse et metallion chelatert til en chelator som angitt ovenfor. I noen
25 utførelsesformer er metallionet et radionuklid. Radioaktivt merkede midler, forbindelser og preparater tilveiebragt ved foreliggende oppfinnelse er tilveiebragt med en egnet mengde av radioaktivitet. For eksempel i dannelse av ^{99m}Tc radioaktive komplekser er det generelt foretrukket å danne radioaktive komplekser i løsninger inneholdende radioaktivitet i konsentrasjoner av fra ca. 0,01 millicurie (mCi) til ca. 300 mCi pr. ml.

Radioaktivt merkede avbildningsmidler tilveiebragt ved foreliggende oppfinnelse kan anvendes for visualisering av områder hos en pattedyr-kropp. I henhold til
30

foreliggende oppfinnelse blir avbildningsmidler administrert ved hvilken som helst metode kjent for fagfolk på området. For eksempel kan administrering være i en enkel-enhet injiserbar dose. Hvilken som helst av de vanlige bærere kjent av fagfolk på området, så som sterile saltløsninger eller plasma for injeksjon, kan anvendes etter radiomerking for fremstilling av forbindelsene. Generelt har en enhetsdose som skal administreres en radioaktivitet på ca. 0,01 mCi til ca. 300 mCi, fortrinnsvis 10 mCi til ca. 200 mCi. Løsningene som skal injiseres som enhetsdose er fra ca. 0,01 ml til ca. 10 ml.

Etter intravenøs administrering av en diagnostisk effektive mengde av et preparat ifølge foreliggende oppfinnelse kan avbildning utføres. Avbildning av et område hos et individ, så som et organ eller tumor kan om ønsket skje, i løpet av timer eller enda lenger, etter at det radioaktivt merkede reagens er innført hos en pasient. I de fleste tilfeller vil en tilstrekkelig mengde av den administrerte dose akkumulert i et området avbildes i løpet av ca. 0,1 til en time. Som angitt ovenfor kan avbildning utføres ved anvendelse av hvilken som helst metode kjent for fagfolk på området. Eksempler omfatter PET, SPECT og gamma scintigrafi. I gamma scintigrafi består radiomerkingen av et gamma-stråle emitterende radionuklid og radiotraceren er lokalisert ved anvendelse av et gamma-stråle detekterende kamera. Det avbildede området er detekterbart fordi radiotraceren er valgt enten for å lokalisere et patologisk område (betegnet positiv kontrast) eller, alternativt er radiotraceren valgt spesifikt ikke til å lokalisere et slikt patologisk område (betegnet negative kontrast).

H. Sett

Visse utførelsesformer av foreliggende oppfinnelse angår generelt et sett for fremstilling av et avbildnings eller diagnostisk middel. I noen utførelsesformer omfatter settet for eksempel én eller flere forseglede beholdere som inneholder en forutbestemt mengde av et chelator-målsøkende ligandkonjugat. I noen utførelsesformer omfatter settet videre en forseglet beholder inneholdende et metallion. For eksempel kan metallionet være et radionuklid eller et kaldt metallion.

Et sett ifølge foreliggende oppfinnelse kan omfatte et forseglet medisinglass inneholdende en forutbestemt mengde av en chelator ifølge foreliggende oppfinnelse og en tilstrekkelig mengde av reduksjonsmiddel for å merke forbindelsen med et metallion. I noen utførelsesformer av foreliggende oppfinnelse omfatter settet et metallion som er et radionuklid. I visse ytterligere utførelsesformer er radionuklidet ^{99m}Tc . I ytterligere

utførelsesformer av foreliggende oppfinnelse er chelatoren konjugert til et målsøkende ligand som kan være hvilken som helst av de målsøkende ligander beskrevet andre steder i denne søknaden.

5 Settet kan også inneholde konvensjonelle farmasøytiske tilsetningsmaterialer så som for eksempel farmasøytisk akseptable salter for å regulere det osmotiske trykket, buffere og konserveringsmidler.

10 I visse utførelsesformer er en antioksidant omfattet i preparatet for å forhindre oksidasjon av chelatorgruppen. I visse utførelsesformer er antioksidanten vitamin C (askorbinsyre). Det er imidlertid antatt at hvilket som helst annet antioksidant kjent for fagfolk på området, så som tokoferol, pyridoxin, tiamin eller rutin også kan anvendes. Komponentene i settet kan være som væske, frosset eller tørr form. I en foretrukket utførelsesform er settets komponenter gitt i lyofilisert form.

15 Det kalde (dvs. ikke-radioaktivitet inneholdende) ”instant” settet er betraktet som et kommersielt produkt. Det kalde ”instant” settet kan tjene et radiodiagnostisk formål ved tilsetning av pertechnetat til medisinglass med API og fyllmidler (midler som ikke enda er testet) . Teknologien er kjent som “shake og shoot” metode for fagfolk på området. Fremstillingstiden for radiofarmasøytiske midler vil være mindre enn 15 min. Samme sett kan også omfatte chelatorer eller chelator-målsøkende ligandkonjugater som kan være chelatert med forskjellige metaller for forskjellige avbildningsapplikasjoner. For eksempel, 20 kobber-61 (3,3 timers halveringstid) for PET; gadolinium for MRI. Det kalde settet selv vil kunne anvendes for prodrugformål for å behandle sykdom. For eksempel kan settet anvendes i vev-spesifikk målrettet avbildning og terapi.

I. Hyperproliferativ sykdom

25 Visse aspekter ved foreliggende oppfinnelse angår preparater hvor en terapeutisk gruppe er konjugert til en chelator ifølge foreliggende oppfinnelse. Når et metallion er chelatert til en chelator eller til både en chelator og dens konjugerte målsøkende ligand, kan preparatet ifølge foreliggende oppfinnelse, i visse utførelsesformer, være anvendelige i dobbelt avbildning og terapi. I visse spesielle utførelsesformer er den terapeutiske gruppe en gruppe som er et middel som er kjent eller mistenkt å være fordelaktig for behandling eller forebygging av hyperproliferativ sykdom hos et individ. Individet kan være et dyr, så 30 som et pattedyr. I visse spesielle utførelsesformer er individet et menneske.

I andre utførelsesformer av foreliggende oppfinnelse er metallionet et terapeutisk metallion (e.g., Re-188, Re-187, Re-186, Ho-166, Y-90, Sr-89 og Sm-153) og chelator-metallion chelatet er et middel som er et terapeutisk middel (og ikke et avbildningsmiddel) som kan anvendes for behandling eller forebygging av en hyperproliferativ sykdom.

5 En hyperproliferativ sykdom er her definert som hvilken som helst sykdom forbundet med unormal cellevekst eller unormal celleomsetning. For eksempel kan den hyperproliferative sykdommen være kreft. Betegnelsen "kreft" som anvendt her er definert som en ukontrollert og progressive vekst av celler i et vev. En fagperson er kjent med at andre synonyme betegnelser eksisterer, så som neoplasme eller ondartet sykdom eller
10 tumor. Hvilken som helst type kreft er forutsett for behandling ved metodene ifølge foreliggende oppfinnelse. For eksempel kan kreften være brystkreft, lungekreft, eggstokk-kreft, hjernekreft, leverkreft, cervikal kreft, kolonkreft, nyre-kreft, hudkreft, hode- og hals-kreft, benkreft, spiserørskreft, blærekreft, uterin kreft, magekreft, pankreatisk kreft, testikkel-kreft, lymfom eller leukemi. I andre utførelsesformer av foreliggende oppfinnelse
15 er kreften metastasisk kreft.

J. Dobbel kjemoterapi og strålingsterapi ("Radiokjemoterapi")

I visse utførelsesformer av foreliggende oppfinnelse er preparatene ifølge foreliggende oppfinnelse egnet for dobbel kjemoterapi og strålingsterapi (radiokjemoterapi). For eksempel kan chelatoren som angitt her være chelatert til et
20 metallion som er et terapeutisk metallion, så vel som et målsøkende ligand som er en terapeutisk gruppe (så som en anti-kreft gruppe). Som et annet eksempel kan et terapeutisk metallion være chelatert til bådeen chelator og dens målsøkende ligandkonjugat.

For eksempel kan metallionet være en beta-emitter. Som her definert er en beta emitter hvilket som helst middel som emitterer beta-energi i hvilket som helst område.
25 Eksempler på beta-emitterer omfatter Re-188, Re-187, Re-186, Ho-166, Y-90 og Sn-153. En fagmann på området ville være fortrolig med disse midler for anvendelse ved behandling av hyperproliferativ sykdom, så som kreft.

Fagfolk på området vil være fortrolig med utformingen av kjemoterapeutiske protokoller og strålingsterapiprotokoller som kan anvendes i administrering av
30 forbindelsene. Som angitt nedenfor kan disse midler anvendes i kombinasjon med andre terapeutiske modaliteter rettet mot behandling av en hyperproliferativ sykdom, så som

kreft. Videre vil en fagmann på området være fortrolig med å velge en passende dose for administrering til individet. Protokollen kan involvere en enkel dose eller multiple doser. Pasienten ville være overvåket for toksisitet og respons på behandling ved anvendelse av protokoller som er velkjent for fagfolk på området.

5 **K. Farmasøytiske preparater**

Farmasøytiske preparater ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter en terapeutisk eller diagnostisk effektive mengde av et preparat ifølge foreliggende oppfinnelse. Frasene “farmasøytiske eller farmakologisk akseptable” eller “terapeutisk effektive” eller “diagnostisk effektive” angir molekylære enheter og preparater som ikke produserer en
10 ugunstig, allergisk eller andre uheldige reaksjoner når passende administrert til et dyr, så som for eksempel et menneske. Fremstilling av terapeutisk effektive eller diagnostisk effektive preparater vil være kjent for fagfolk på området i lys av foreliggende beskrivelse, som eksemplifisert ved Remingtons Pharmaceutical sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990. Videre, for dyr (*e.g.*, human) administrering vil det forstås at preparater
15 skal tilfredsstillende krav til sterilitet, pyrogenisitet, generell sikkerhet og renhetsstandarder som nødvendig fra FDA Office of Biological Standards.

Som anvendt her omfatter “et preparat omfattende en terapeutisk effektiv mengde” eller “et preparat omfattende en diagnostisk effektive mengde” hvilke som helst og alle løsningsmidler, dispersjonsmedia, belegg, overflateaktive midler, antioksidanter,
20 konserveringsmidler (*e.g.*, antibakterielle midler, antifungale midler), isotoniske midler, absorpsjonsforsinkende midler, salter, konserveringsmidler, medikamenter, medikament stabiliseringsmidler, geler, bindemidler, tilsetningsmidler, desintegreringsmidler, glattemidler, søtningmidler, smaksgivende midler, fargemidler, slik som materialer og kombinasjoner derav, som ville være kjent for en fagmann på området. Bortsett fra hvilke
25 som helst konvensjonelle bærere som er inkompatible med den aktive bestanddel, er dens anvendelse i foreliggende preparater forutsett.

Preparatene ifølge foreliggende oppfinnelse kan omfatte forskjellige typer av bærere avhengig av hvorvidt det skal administreres i fast stoff, væske eller aerosol form og hvorvidt det trenger å være sterilt for slike administreringsmetoder som injeksjon.
30 Preparatene ifølge foreliggende oppfinnelse kan administreres intravenøst, intradermalt, intraarterielt, intraperitonealt, intralesjonalt, intrakranielt, intraartikulært, intraprostatisk, intrapleuralt, intratrakealt, intranasalt, intravitrealt, intravaginalt, intrarektalt, topisk,

intratumoralt, intramuskulært, intraperitonealt, subkutant, subconjunctivalt, intravesikularlt, mukosalt, intraperikardialt, intraumbilikalt, intraokulært, oralt, topisk, lokalt, injeksjon, infusjon, kontinuerlig infusjon, lokalisert perfusjon som bader ("bathing") målceller direkte, via et kateter, via en utskylning, i lipide preparater (e.g., liposomer) eller ved annen metode eller hvilken som helst kombinasjon av de foregående som ville være kjent for en fagmann på området.

Den nødvendige mengde av et preparat ifølge foreliggende oppfinnelse administrert til en pasient kan bestemmes ved fysikalske og fysiologiske faktorer så som kroppsvekt, alvorlighetsgraden av tilstanden, vevet som skal avbildes, typen sykdom som behandles, tidligere eller samtidige avbildninger eller terapeutiske intervensjoner, idiopati til pasienten og administreringsveien. Praktikerer ansvarlig for administrering vil i alle tilfelle, bestemme konsentrasjonen av aktiv bestanddel(er) i et preparat og passende dose(r) til individet.

I visse utførelsesformer kan farmasøytiske preparater for eksempel omfatte minst ca. 0,1% av chelator-metallion chelat. I andre utførelsesformer kan den aktive forbindelse for eksempel utgjøre mellom ca. 2% til ca. 75% av vekten til enheten eller mellom ca. 25% til ca. 60%, og hvilket som helst område avledet av dette området. I andre ikke-begrensede eksempler kan en dose også omfatte fra ca. 0,1 mg/kg/kroppsvekt til ca. 1000 mg/kg/kroppsvekt eller hvilken som helst mengde innen dette område eller hvilken som helst mengde større enn 1000 mg/kg/kroppsvekt pr. administrering.

I alle tilfeller kan preparatet omfatte forskjellige antioksidanter for å forsinke oksidasjon av én eller flere komponenter. I tillegg kan forhindring av virkningen av mikroorganismer oppnås med konserveringsmidler så som forskjellige antibakterielle og antifungale midler, omfattende, men ikke begrenset til parabener (e.g., metylparabener, propylparabener), klorbutanol, fenol, sorbinsyre, thimerosal eller kombinasjoner derav.

Preparatene ifølge foreliggende oppfinnelse kan formuleres i en fri base, nøytral eller saltform. Farmasøytisk akseptable salter omfatter saltene dannet med de frie karboksylgrupper avledet fra uorganiske baser så som for eksempel natrium, kalium, ammonium, kalsium eller jern(III) hydroksider; eller slike organiske baser som isopropylamin, trimetylamin, histidin eller prokain.

I utførelsesformer hvor preparatet er i væskeform kan en bærer være et løsningsmiddel eller dispersjonsmedium omfattende, men ikke begrenset til, vann, etanol,

polyol (*e.g.*, glycerol, propylenglykol, flytende polyetylen glykol, *etc.*), lipider (*e.g.*, triglycider, vegetabiliske oljer, liposomer) og kombinasjoner derav. Passende fluiditet kan oppnås for eksempel ved anvendelse av et belegg, så som lecitin; ved opprettholdelse av nødvendig partikkelstørrelse ved dispersjon i bærere så som for eksempel væske polyol eller lipider; ved anvendelse av overflateaktive midler så som for eksempel hydroksypropylcellulose; eller kombinasjoner derav. I mange tilfeller vil det være foretrukket å omfatte isotoniske midler, så som for eksempel sukkere, natriumklorid eller kombinasjoner derav.

Sterile injiserbare løsninger kan fremstilles ved anvendelse av teknikker så som filtrert sterilisering. Generelt blir dispersjoner fremstilt ved å innkorporere de ulike steriliserte aktive bestanddeler inn i en steril bærer som inneholder det basiske dispersjonsmedium og/eller de andre bestanddeler. I tilfellet av sterile pulvere for fremstilling av sterile injiserbare løsninger, suspensjoner eller emulsjon er de foretrukne fremstillingsmetoder vakuump-tørking eller frysetørkingsteknikker som gir et pulver av den aktive bestanddel pluss hvilke som helst ytterligere ønskede bestanddel fra tidligere sterilefiltrert væskemedium. Væskemediet bør om nødvendig hensiktsmessig og det flytende fortynningsmiddel først gjøres isotonisk før injeksjon med tilstrekkelig saltløsning eller glukose. Fremstilling av meget konsentrerte preparater for direkte injeksjon er også omfattet, hvor anvendelse av DMSO (dimetylsulfoksid) som løsningsmiddel er forutsatt, hvilket resulterer i ekstremt rask penetrering og levering av høye konsentrasjoner av det aktive middel til et lite område.

Preparatet må være stabilt under fremstillingsbetingelser og lagring og konservert mot den forurensende virkning av mikroorganismer, så som bakterier og sopper. Det vil forstås at for eksempel endotoksinforurensning skal holdes på et minimalt og sikkert nivå dvs. mindre enn 0,5 ng/mg protein.

I spesielle utførelsesformer kan forlenget absorpsjon av et injiserbar preparat oppnås ved anvendelsen av midler i preparatene som forsinket absorpsjon, så som for eksempel aluminiummonostearat, gelatin eller kombinasjoner derav.

L. Kombinjonsterapi

Visse aspekter ved foreliggende oppfinnelse angår preparater omfattende en chelator som er konjugert til et målsøkende ligand som er en terapeutisk gruppe. I andre

utførelsesformer omfatter chelatoren en aminosyresekvens som er en terapeutisk aminosyresekvens.

Disse preparater kan anvendes ved behandling av sykdommer, så som kreft og kardiovaskulær sykdom, sammen med et annet middel eller terapimetode. Behandling med disse preparater ifølge foreliggende oppfinnelse kan gå forut for eller etterfølge andre terapimetoder over intervaller i området fra minutter til uker. I utførelsesformer hvor et annet middel blir administrert, vil man sørge for at det ikke er en betydelig tidsperiode mellom tidspunktene for hver leveranse, slik at midlene fortsatt vil være i stand til utøve en fordelaktig kombinert effekt på cellen. For eksempel er det antatt at en kan administrere to, tre eller flere doser av et middel med preparatene ifølge foreliggende oppfinnelse hovedsakelig samtidig (*i.e.*, innen mindre enn omtrent ett minutt). I andre aspekter kan et terapeutisk middel eller metode administreres i løpet av ca. 1 minutt til ca. 48 timer eller mer før og/eller etter administrering av en terapeutisk mengde av et preparat ifølge foreliggende oppfinnelse eller før og/eller etter hvilken som helst tidsangivelse ikke angitt her. I visse andre utførelsesformer kan et preparat ifølge foreliggende oppfinnelse administreres i løpet av fra ca. 1 dag til ca. 21 dager før og/eller etter administrering av en annen terapeutisk modalitet, så som kirurgi eller genterapi. I noen situasjoner kan det imidlertid være ønskelig å utvide tidsperioden for behandling betydelig, hvor det går mange uker (*e.g.*, omtrent 1 til 8 uker eller mer) mellom de respektive administreringer.

Forskjellige kombinasjoner kan anvendes som demonstrert nedenfor, hvor et konjugat ifølge foreliggende oppfinnelse er betegnet "A" og det sekundære middel, som kan være hvilket som helst annet terapeutisk middel eller metode, er "B":

A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B B/A/B/B

B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A

B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

Administrering av preparatene ifølge foreliggende oppfinnelse til en pasient vil følge generelle protokoller for administrering av kjemoterapeutika, med hensyntagen til toksisitet, om noen, for disse midlene. Det er forventet at behandlingscyklene kan gjentas om nødvendig. Det også er antatt at forskjellige standardterapi, så vel som kirurgisk intervensjon, kan anvendes i kombinasjon med de beskrevne midler. Disse terapier

omfatter, men er ikke begrenset til, ytterligere farmakoterapi (så som kjemoterapi for kreft), ytterligere radioterapi, immunoterapi, genterapi og kirurgi.

1. Kjemoterapi

Kreftterapier omfatter også en rekke kombinasjonsterapier med både kjemisk- og strålebasert behandling. Kombinasjonskjemoterapier omfatter for eksempel cisplatin (CDDP), karboplatin, prokarbazin, mekloretoamin, cyklofosamid, camptothecin, ifosfamid, melphalan, klorambucil, busulfan, nitrosurea, dactinomycin, daunorubicin, doxorubicin, bleomycin, plicomycin, mitomycin, etoposid (VP16), tamoxifen, raloxifen, østrogenreseptor-bindemidler, taxol, gemcitabien, navelbin, farnesyl-proteintransferaseinhibitorer, transplatina, 5-fluoruracil, vincristin, vinblastin og metotrexat eller hvilke som helst analoger eller derivat-varianter av foregående.

2. Radioterapi

Andre faktorer som forårsaker DNA skade og har vært anvendt i stor utstrekning omfatter det som er vanlig kjent som γ -stråler, røntgen og/eller dirigert levering av radioisotoper til tumorceller. Andre former for DNA skadende faktorer er også forutsett så som mikrobølger og UV-bestråling. Det er mest sannsynlig at alle disse faktorer gir et bredt skadeområde på DNA, på forløperne til DNA, på replikasjon og reparasjon av DNA og på sammensetningen og opprettholdelse av kromosomer. Doseområder for røntgenstråler er fra daglige doser på 50 til 200 røntgen over lengre perioder (3 til 4 uker), til enkelt doser på 2000 til 6000 røntgen. Doseområder for radioisotoper varierer sterkt og avhenger av halveringstiden til isotopen, styrken og type emittert stråling og opptaket av de neoplastiske cellene. Betegnelsene “kontaktet” og “eksponert” når anvendt om en celle, blir anvendt her for å beskrive fremgangsmåten ved hvilken en terapeutisk konstruksjon og et kjemoterapeutisk eller radioterapeutisk middel blir levert til en målcelle eller blir direkte sammenstilt med målcellen. For å oppnå celledrap eller stagnasjon blir begge midler levert til en celle i en kombinert mengde effektive for å drepe cellen eller forhindre denne fra å dele seg.

3. Immunoterapi

Immunoterapeutiske midler generelt gjør bruk av immune effektorceller og målsøkende molekyler som kan destruere kreftceller. Den immune effektor kan for

eksempel være et antistoff spesifikt for noen markør på overflaten av en tumorcelle. Antistoffet alene kan tjene som en effektor ved terapi eller den kan rekruttere andre celler til faktisk effektcelle ødelegelse. Antistoffet også kan være konjugert til et medikament eller toksin (kjemoterapeutisk, radionukleotid, ricin en kjede, cholera toksin, pertussis toksin, *etc.*) og tjene kun som et målsøkende middel. Alternativt kan effektoren være en lymfocytt som bærer et overflatemolekyl som interagerer, enten direkte eller indirekte, med en måltumorcelle. Forskjellige effektorceller omfatter cytotoksiske T-celler og NK celler.

Immunoterapi kan således anvendes som del av en kombinert terapi, sammen med genterapi. Den generelle fremgangsmåten for kombinert terapi er beskrevet nedenfor. Generelt må tumoren-cellen bære noen markører som er mottagelig for målsøkende midler, *i.e.*, ikke er til stede på majoriteten av andre celler. Mange tumormarkører eksisterer og hvilke som helst av disse kan være egnet for målsøkende midler i sammenheng med foreliggende oppfinnelse. Vanlige tumormarkører omfatter carcinoembryonisk antigen, prostataspesifikk antigen, urinært-tumor-assosiert-antigen, føtalt antigen, tyrosinase (p97), gp68, MERKE-72, HMFG, Sialyl Lewis Antigen, MucA, MucB, PLAP, østrogenreseptor, laminin reseptor, *erb B* og p155.

4. Gener

I enda en annen utførelsesform er den sekundære behandlingen genterapi hvor et terapeutisk preparat blir administrert før, etter eller samtidig med de terapeutiske midler ifølge foreliggende oppfinnelse. Levering av en terapeutisk mengde av et preparat ifølge foreliggende oppfinnelse sammen med en vektor som koder for et genprodukt vil ha en kombinert anti-hyperproliferativ effekt på målvev.

5. Kirurgi

Omtrent 60% av personer med kreft vil gjennomgå kirurgi av en eller annen type som omfatter preventativ, diagnostisk eller "staging", kurativ og palliativ kirurgi. Kurativ kirurgi er kreftbehandling som kan anvendes sammen med andre terapier, så som behandlingen ifølge foreliggende oppfinnelse, kjemoterapi, radioterapi, hormonell terapi, genterapi, immunoterapi og/eller alternative terapier. Kurativ kirurgi omfatter reseksjon hvor alle eller deler av cancerøst vev fjernes fysisk, kuttet ut og/eller ødelegges. Tumor-reseksjon angir fysisk fjerning av minst del av en tumor. I tillegg til tumor-reseksjon

omfatter behandling med kirurgi laserkirurgi, cryokirurgi, elektrokirurgi og mikroskopi-kontrollert kirurgi (Mohs kirurgi). Det er videre forutsett at foreliggende oppfinnelse kan anvendes sammen med fjerning av overfladisk kreft, forløpere til kreft eller tilfeldige mengder av normalt vev.

5 **M. Andre utførelsesformer av foreliggende oppfinnelse**

I ett aspekt angår foreliggende oppfinnelse generelt en metode for syntese av en chelator, så som EC, omfattende minst tre funksjonelle grupper, idet metoden omfatter å tilveiebringe en chelator og enten:

- 10 (a) beskytte minst én første funksjonelle gruppe med chelatoren med et første beskyttelsesmiddel for å danne en første beskyttet chelator; eller
- (b) chelatere chelatoren til et metallion for å danne en metallion-merket chelator.

15 Hvilken som helst syntesemetode som beskrevet her, slik som denne, kan skje i et organisk medium, som beskrevet her. Metoden kan videre omfatte minst ett rensetrinn, som beskrevet her. Chelatorer, funksjonelle grupper, metallioner og typer av chelatering og konjugering som kan anvendes ved metodene ifølge foreliggende oppfinnelse er kjent for fagfolk på området og er beskrevet her. Chelatoren kan videre omfatte et avstandsstykke som beskrevet her, så som etylen. Slike chelatorer er anvendelige mellomprodukter for fremstilling av chelator-målsøkende ligandkonjugater.

20 I noen utførelsesformer omfatter metoden beskyttelse av minst én første funksjonelle gruppe på chelatoren med et første beskyttelsesmiddel for å danne en første beskyttet chelator. I visse utførelsesformer er den første funksjonelle gruppe en tiol funksjonell gruppe. I visse utførelsesformer er det første beskyttelsesmiddel et tiolbeskyttelsesmiddel. I ytterligere utførelsesformer er tiolbeskyttelsesmidlet valgt fra en

25 gruppe bestående av et alkylhalogenid, et benzyhalogenid, et benzoylhalogenid, et sulfonylhalogenid, et trifenylmetylhalogenid, et metoksytrifenylmetylhalogenid og cystein.

Metoden kan, i noen utførelsesformer, omfatte beskyttelse av en andre funksjonelle gruppe med et annet beskyttelsesmiddel for å danne en ytterligere beskyttet chelator. I visse utførelsesformer omfatter den første funksjonelle gruppe minst én tiol-funksjonell

30 gruppe og den andre funksjonelle gruppe omfatter minst én amin-funksjonell gruppe. I noen utførelsesformer beskyttet først en tiol-funksjonell gruppe med et tiol

beskyttelsesmiddel og deretter en amin-funksjonell gruppe med et aminbeskyttelsesmiddel. I ytterligere utførelsesformer er et aminbeskyttelsesmiddel valgt fra gruppen bestående av benzylklorformiat, *p*-nitro-klorbenzylformat, etylklorformiat, di-tert-butyl-dikarbonat, trifenylmetylklorid og metoksytrifenylmetyl chorid. Et eksempel på en chelator som kan fremstilles omfatter etylendicystein, hvor de to tiolgruppene på etylendicystein er beskyttet med to ekvivalenter av et tiolbeskyttelsesmiddel etterfulgt av beskyttelse av de to amin grupper på etylendicystein med to ekvivalenter av et aminbeskyttelsesmiddel. Siden tiol grupper er mer reaktive enn amingrupper vil tiol grupper typisk beskyttes før amingruppene.

I andre utførelsesformer omfatter metoden videre fjerning av én eller flere beskyttelsesgrupper fra hvilket som helst preparat beskrevet her omfattende én eller flere beskyttelsesgrupper. Beskyttelsesgruppene kan fjernes, for eksempel fra chelatorgruppene, den målsøkende ligandgruppe eller begge grupper i ett eller flere trinn før eller etter at et chelator-målsøkende ligandkonjugat chelateres til et metallion, som beskrevet her. Beskyttelsesgrupper er beskrevet mer detaljert her, omfattende deres installasjon og fjerning.

Hvilket som helst preparat ifølge foreliggende oppfinnelse kan renses via hvilken som helst metode kjent for fagfolk på området. Metoder for rensning er beskrevet mer detaljert her. I noen utførelsesformer er den første beskyttede chelator mellom ca. 90% og ca. 99,9% ren. I noen utførelsesformer er den andre beskyttede chelator mellom ca. 90% og ca. 99,9% ren.

I noen utførelsesformer omfatter metoder ifølge foreliggende oppfinnelse videre konjugering av en chelator til et målsøkende ligand, hvor det målsøkende ligand og/eller chelatoren omfatter minst én funksjonell gruppe for å danne et chelator-målsøkende ligandkonjugat. I noen utførelsesformer er en funksjonell gruppe med det målsøkende ligand beskyttet med minst ett beskyttelsesmiddel før konjugering til chelatoren. I noen utførelsesformer er minst én funksjonell gruppe en karboksylsyre-funksjonell gruppe. I noen utførelsesformer danner de funksjonelle gruppene til chelatoren og det målsøkende ligand sammen et chelat. Chelatering av metallionet til chelatoren kan være ved hvilken som helst metode kjent for fagfolk på området.

Et chelator-målsøkende ligandkonjugat ifølge foreliggende oppfinnelse kan videre omfatte en linker mellom chelatoren og det målsøkende ligand, som beskrevet her. Som

nevnt kan det målsøkende ligand være av hvilken som helst type kjent for fagfolk på området og slike ligander er beskrevet mer detaljert her.

Andre generelle aspekter ved foreliggende oppfinnelse forutsetter en metode for syntese av et metallion merket-chelator-målsøkende ligandkonjugat, omfattende:

- 5 (a) tilveiebringe en beskyttet chelator omfattende minst tre funksjonelle grupper beskyttet med minst ett beskyttelsesmiddel;
- (b) konjugering av den beskyttede chelator til et målsøkende ligand for å danne et chelator-målsøkende ligandkonjugat;
- (c) fjerning av minst én beskyttelsesgruppe fra det chelator-målsøkende
10 ligandkonjugat;
- (d) chelatering av et metallion til chelatoren til det chelator-målsøkende ligandkonjugat; og
- (e) fjerning av hvilke som helst gjenværende beskyttelsesgrupper.

Chelatorene, beskyttelsesmidler, funksjonelle grupper, konjugeringsmodus, målsøkende ligand, metode for fjerning av en beskyttelsesgruppe, chelateringsmodus og
15 metallioner kan være av hvilken som helst type beskrevet her. Metoden kan skje i et organisk medium, som beskrevet her. Metoden kan omfatte ett eller flere rensetrinn, som beskrevet her. I noen utførelsesformer er minst én funksjonell gruppe på det målsøkende ligand beskyttet med minst ett beskyttelsesmiddel før konjugering. I foretrukne
20 utførelsesformer er tre eller fire atomer på chelatoren tilgjengelig for chelatering.

Andre generelle aspekter ved foreliggende oppfinnelse forutsetter en metode for syntese av et metallion merket-chelator-målsøkende ligandkonjugat omfattende:

- (a) tilveiebringe en chelator omfattende minst tre funksjonelle grupper;
- (b) chelatering av et metallion til chelatoren for å danne en metallion merket-
25 chelator;
- (c) konjugering av metallionet merket-chelator til et målsøkende ligand.

Chelatorene, funksjonelle grupper, konjugeringsmodus, målsøkende ligander, chelateringsmodus og metallioner kan være av hvilken som helst type beskrevet her. Metoden kan skje i et organisk medium, som beskrevet her. Metoden kan omfatte ett eller
30 flere rensetrinn, som beskrevet her. I noen utførelsesformer er minst én funksjonell gruppe på det målsøkende ligand beskyttet med minst ett beskyttelsesmiddel før konjugering. Metoden kan videre omfatte fjerning av alle beskyttelsesgrupper fra metallionmerket-

chelator-målsøkende ligandkonjugat. Metoden forutsetter også, i visse utførelsesformer, at minst én funksjonell gruppe på det målsøkende ligand er beskyttet med minst ett beskyttelsesmiddel før konjugering.

5 Foreliggende oppfinnelse forutsetter også sett for fremstilling av et avbildningsmiddel, et kjemoterapeutisk middel eller et radio/kjemoterapeutisk middel, omfattende én eller flere forseglede beholdere og en forutbestemt mengde av hvilket som helst preparat som beskrevet her i én eller flere forseglede beholdere. Foreliggende oppfinnelse forutsetter også, i noen utførelsesformer, et avbildnings-, et kjemoterapeutisk- eller radio/kjemoterapeutisk middel, omfattende hvilket som helst preparat som beskrevet
10 her.

I noen utførelsesformer forutsetter foreliggende oppfinnelse en metode for avbildning eller behandling av et individ, omfattende administrering til individet en farmasøytisk effektiv mengde av hvilket som helst preparat som beskrevet her. Individet kan være et pattedyr, så som et menneske.

15 **N. Metoder for diagnose, behandling eller avbildning av et individ med kjent eller mistenkt hjertesykdom**

Utførelsesformer av foreliggende oppfinnelse angår også generelt metoder for diagnose, behandling eller avbildning i et individ med kjent eller mistenkt hjertesykdom. Individet kan være hvilket som helst individ, så som et pattedyr eller fugle-arter.
20 Pattedyret, kan for eksempel være en hund, katt, rotte, mus eller menneske. I foretrukne utførelsesformer er individet et menneske med kjent eller mistenkt kardiovaskulær sykdom.

Den kardiovaskulære sykdom kan være hvilken som helst sykdom i hjertet eller blodkar. Blodkaret kan være et koronært kar eller være forskjellig fra et koronært kar.
25 Karet kan være en arterie, vene, arteriole, venule eller kapillær.

Eksempler på kardiovaskulære sykdommer omfatter sykdommer i hjertet, så som myokardialt infarkt, myokardial ischemi, angina pectoris, kongestiv hjertesvikt, kardiomyopati (medfødt eller ervervet), arytmi eller valvulær hjertesykdom. I spesielle utførelsesformer er individet kjent for eller mistenkt å ha myokardial ischemi.

30 Individet kan for eksempel være en pasient som kommer til en klinikk med tegn eller symptomer som antyder myokardial ischemi eller myokardialt infarkt. Avbildning av

hjertet til individet for diagnose av sykdom kan involvere administrering til individet en farmasøytisk effektiv mengde av et metallion merket chelator-målsøkende ligandkonjugat syntetisert ved anvendelse av hvilken som helst av metodene angitt her. Avbildning kan utføres ved anvendelse av hvilken som helst avbildningsmodalitet kjent for fagfolk på området. I spesielle utførelsesformer involverer avbildningen anvendelse radionuklid-basert avbildningsteknologi, så som PET eller SPECT. I spesielle utførelsesformer er det metallionmerkede radionuklid-målsøkende ligandkonjugat $^{99m}\text{Tc-EC-glucosamin}$. Glucosamin tas aktivt opp av levedyktig myokardialt vev. Områder med ischemisk myokardium vil ta opp mindre eller intet konjugat. Alvorlighetsgraden av ischemi kan bedømmes visuelt eller gradert avhengig av størrelse til signalet som blir målt ved anvendelse av hvilken som helst metode kjent for fagfolk på området. I noen utførelsesformer blir avbildning ved anvendelse av hvilket som helst av konjugatene angitt her utført før, under eller etter avbildning av hjertet ved anvendelse av en annen avbildningsmodalitet. For eksempel kan den andre avbildningsmodaliteten være talliumscinigrafi.

Myokardial Perfusjon SPECT (MPS) består av en kombinasjon av en stressmodalitet (øvelse eller farmakologisk) med hvile- og stressadministrering og avbildning av radiofarmasøytiske midler. Tallium har utmerkede fysiologiske egenskaper for myokardial perfusjonsavbildning. Ved å være godt ekstrahert under den første passasje gjennom den koronare sirkulasjon er et lineært slektskap mellom blodstrømmen til levedyktig myokardium og talliumopptak vist under forsøk; imidlertid, ved svært høye strømningsnivåer forekommer "roll-off" i opptaket. Tallium redistributes over tid som en ubundet kaliumanalog. Dens innledende fordeling er proporsjonal med regional myokardial perfusjon, og ved likevekt er distribusjonen av tallium proporsjonal med den regionale kaliumpool, noe som reflekterer levedyktig myokardium. Mekanismene ved talliumredistribusjon er differensiell utvaskningshastighet mellom hypoperfusert, men levedyktig myokardium, og normale soner og "wash-in" til initielle hypoperfuserte soner. Utvaskningshastigheten til tallium er konsentrasjonsgradienten mellom den myokardiale celle og blodet. Det er en langsommere blodutskillelse av tallium etter hvile eller lav-nivå forsøksinjeksjoner. Diffuse langsame utvaskningshastigheter, som etterligner diffus ischemi, kan observeres i normale pasienter som ikke oppnår tilstrekkelig stressnivåer. Hyperinsulinemiske tilstander forsinker redistribusjon, hvilket fører til en underestimert av levedyktig myokardium; således er faste anbefalt før og i 4 timer etterfølgende

talliuminjeksjon. Dette er grunnen til at hvis EC-G blir anvendt som en levedyktighetsmiddel i kombinasjon med tallium vil det angi det nøyaktige område av interesse som ville være levedyktighetsområdet (Angello *et al.*, 1987; Gutman *et al.*, 1983; Pohost *et al.*, 1977).

5 Avbildning ved anvendelse av hvilket som helst av metallionmerket chelator-målsøkende ligandkonjugat ifølge foreliggende oppfinnelse kan også utføres sammen med andre diagnostiske metoder, så som måling av hjerte-isozymer eller hjerte-kateterisasjon. Avbildningen kan utføres ved forskjellige intervaller etter start av symptomene eller kan utføres for å bedømme endringer i myokardial perfusjon over tid.

10 **O. Eksempler**

De følgende eksempler er inkludert for å demonstrere visse aspekter ifølge oppfinnelsen. Det bør være forstått av fagfolk på området at teknikkene ifølge oppfinnelsen beskrevet i eksemplene som følger representerer teknikker oppdaget av oppfinner å fungere godt i praksis. De følgende figurer, kjemiske strukturer og syntetiske
15 detaljer gir visse forbindelser.

EKSEMPEL 1

Ikke-begrensende eksempel på en organisk syntese av N,N-etylendicystein-glucosamin (EC-G). Se FIG. 1.

Trinn 1: Syntese av S,S'-bis-benzyl-N,N'-etylendicystein (Bz-EC)

20 Cystein-HCl (30 g) ble oppløst i vann (100 ml). Til dette ble 37% formaldehyd (22,3 ml) tilsatt og reaksjonsblandingen ble omrørt natten over ved romtemperatur. Pyridin (25 ml) ble deretter tilsatt og et presipitat dannet. Krystallene ble separert og vasket med etanol (50 ml), deretter filtrert med en Buchnertrakt. Krystallene ble utgidd med petroleter (150 ml), igjen filtrert og tørket. Forløperen, L-tiazolidin-4-karboksylysyre
25 (sm.p. 195 °C, oppgitt 196-197 °C) veide 23,408 g. Forløperen (22 g) ble oppløst i væske-ammoniakk (200 ml) og tilbakeløpskocht. Natrium metall ble tilsatt inntil en vedvarende blå farge oppstod etter 15 min. Ammoniumklorid ble satt til den blå løsningen og løsningsmidlene ble avdampet til tørrhet. Residuet ble oppløst i vann (200 ml) og pH ble justert til 2 med konsentrert HCl. Et presipitat ble dannet, filtrert og vasket med vann
30 (ml). Det faste stoffet ble tørket i en kalsiumklorid-desikkator. EC ble deretter fremstilt 10,7 g (sm.p. 237 °C, oppgitt 251-253 °C). Strukturen av EC ble bekreftet ved H-1 og C-

13 NMR. EC (2,684 g, 10 mmol) ble oppløst i 1N NaOH (40 ml). Benzylklorid (5,063 g, 40 mmol) ble oppløst i dioksan (30 ml) og omrørt. Reaksjonsblandingen ble omrørt i 30 min. pH i løsningen ble justert til 2 med konsentrert HCl. Fellingen ble filtrert og vasket med vann og omkrystallisert fra trifluoreddiksyre, hvilket gir 79,0% (3,5454 g), sm.p. 227-229 °C (dec.) (angitt 229-230 °C). Strukturen av Bz-EC ble bekreftet ved H-1 og C-13 NMR.

Trinn 2: Syntese av S,S'-bis-benzyl-N,N'-bis-CBZ etylendicystein (Cbz-Bz-EC)

Bz-EC (2,243 g, 5 mmol) ble oppløst i natriumkarbonat (1,20 g, 11,2 mmol) løsning og pH ble regulert til 10 ved anvendelse av 1N NaOH. Den endelige vandige volum var 30 ml. Benzylklorformiat (233 ml, 16,5 mmol) ble oppløst i dioksan (0,75 ml) og omrørt. pH ble justert til 10 ved tilsetning av faststoff Na₂CO₃. Reaksjonsblandingen ble omrørt i 2 timer og ekstrahert med dietyleter for å fjerne overskudd av benzylklorformiat (CBZ). pH i den vandige fasen ble justert til 2 med 1N HCl og ekstrahert med etylacetat. Den organiske fasen ble tørket over magnesiumsulfat og løsningsmidlet ble avdampet. Residuet ble kromatografert på en silikagel-kolonne kolonne eluert med CH₂Cl₂:eddiksyre (99:1) til CH₂Cl₂:metanol:eddiksyre (94:5:1), hvilket gir det ønskede produkt 87,2% (3,127 g). Strukturen av Cbz-Bz-EC ble bekreftet ved H-1 og C-13 NMR.

Trinn 3: Syntese av S,S'-bis-benzyl-N,N'-bis-CBZ etylendicystein-glucosamin (tetra acetat) Konjugat (Cbz-Bz-EC-G-4-Ac)

Til en omrørt kolbe av diklormetan (22 ml) ble Cbz-Bz-EC (2,1467 g, 3 mmol) tilsatt. Dette ble etterfulgt av dicykloheksylkarbodiimid (DCC) (2,476 g, 12 mmol) og dimetylaminopyridin (1,466 g, 12 mmol). Tetraacetyleret glucosamin-hydroklorid (2,533 g, 6,6 mmol) (4-Ac-G-HCl) (Oakwood Products Inc., West Columbia, SC) ble satt til blandingen og denne ble omrørt for å fullføre oppløsningen. Strukturen av 4-Ac-G-HCl ble bekreftet ved H-1 og C-13 NMR. Reaksjonsblandingen ble omrørt ved romtemperatur natten over. Vann (0,5 ml) ble tilsatt og det faste stoffet ble filtrert fra. Filtratet ble tørket over magnesiumsulfat og løsningsmidlet ble avdampet. Produktet ble rensset ved silikagel kolonne kolonnekromatografi ved anvendelse av diklormetan:metanol:eddiksyre (9,9:0:0,1) til 56,4:3:0,6 som en mobil fase. Produktet ble isolert 66,4% utbytte (2,7382 g). H-1 og C-13 NMR av Cbz-Bz-EC-G-4-Ac ga bekreftelse så vel som massespektrometri.

Trinn 4: Syntese av N,N'-etylendicystein-glucosamin (EC-G)

Cbz-Bz-EC-G-4-Ac (687,7 mg, 0,5 mmol) ble oppløst i væske-ammoniakk (20 ml) og stykker av natrium (223 mg, 10 mmol) ble tilsatt. Etter tilsetning av all natriumen oppnådde en mørk blå farge i løpet av 20 minutter. Ammoniumklorid (641,9 mg, 12 mmol) ble tilsatt langsomt og den mørke blå fargede løsningen ble fargeløs. Væske-ammoniakken ble fjernet ved nitrogen. Det gjenværende faste stoff ble oppløst i vann og dialysert natten over ved anvendelse av MW<500. Råproduktet veiet 206,7 mg (utbytte: 70%). H-1 og C-13 NMR av den rå EC-G bis-acetylerede forbindelse ble opptatt sammen med massespektra. Molekylionet var 861 som inneholder matriksen 187 og foreldre-ionet 674 (EC-G bis-acetylerede). Hovedionet (100%) var 656 som skyldes tap av vann. EC-G bis-acetylerede forbindelse (200 mg) ble ytterligere rensed ved oppløsning i natriumkarbonat og omrøring i 2 timer. Produktet, EC-G, ble deretter lyofilisert, hvilket gir en vekt på 70 mg. H-1 NMR og C-13 NMR av EC-G ble deretter oppnådd. C-13 NMR av EC-G oppviste 16 vesentlige karbontopper. Massespektra av EC-G var vanskelige oppnå på grunn av dens hydrofilitet og dens tendens til holdes igjen på massespektrometrikolonnen. Imidlertid er EC-G bis-acetylerede forbindelse mindre hydrofil enn EC-G; og således kunne massespektra av EC-G bis-acetylerede oppnås. Massespektra av EC-G viste at det var små urenheter fra EC-G bis-acetylerede forbindelse som er et resultat av ufullstendig hydrolysesprosedyre. H-1 og C-13 NMR av EC-G var nær til de antatte verdier til EC-G. Selv om 10 karbon topper er forventet for den symmetriske strukturen til EC-G har glucosamin 12 karbonatomer istedenfor 6 karbonatomer, hvilket indikerer at glucosamin har to konfigurasjoner. H-1 NMR eksperimentelle verdier syntes imidlertid å ha en noe annen profil enn de antatte verdier; imidlertid ble C-13 NMR eksperimentelle verdier for glucosamin nær til de antatte verdier til glucosamin. Således synes EC-G å ha to konfigurasjoner.

25

EKSEMPEL 2

Ikke-begrensende eksempel på en organisk syntese av $^{187}\text{Re-EC-G}$ ved anvendelse av Re-EC og beskyttet glucosamin.

Se FIG. 2.

$^{187}\text{Re-EC-G}$ ble anvendt som en referansestandard for $^{99m}\text{Tc-EC}$ på grunn av likheten i struktur og lipofilitet. Syntese av kald Re-EC-G er vist i FIG. 2. Til en omrørt etanoløsning ble små metall-natrium flak ("chips") (144,8 mg, 6,3 mmol) tilsatt langsomt inn i 10 ml etanol i en 50 ml flaske under nitrogen. Etter oppløsning av natrium-metallet

30

ble EC (536,8 mg, 2,0 mmol) tilsatt. Reaksjonsblandingen ble omrørt i 1 time ved romtemperatur for å danne EC-Na salt. Trifenylfosfinrheniumklorid ($\text{ReOCl}_3(\text{PPh}_3)_2$, 1,8329 g, 2,2 mmol) ble tilsatt. Den olivengrønne fargen til $\text{ReOCl}_3(\text{PPh}_3)_2$ endret seg til en skog-grønn farge. Reaksjonsblandingen ble omrørt i 1 time og deretter tilbakeløpskokt i 5 30 min. Reaksjonsblandingen ble deretter filtrert og filtratet ble inndampet til tørrhet hvilket gir et grått-blårødt pulver Re-EC (818,4 mg, 80% utbytte). Strukturen av Re-EC ble bekreftet ved H-1 og C-13 NMR og massespektrometri. Re har to isomeriske molekylvekter som er 185 og 187. Derfor oppviser den distinkt to foreldre-ioner med 40:60 forhold.

10 Til omrørt dimetylformamid (4 ml) løsningsmiddel ble Re-EC (116,9 mg, 0,25 mmol) tilsatt etterfulgt av 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-en (DBU) (150 ml, 1,0 mmol). Videre ble dicykloheksylkarbodiimid (DCC) (123,8 mg, 0,6 mmol) tilsatt. Reaksjonsblandingen ble omrørt i 1 time. Tetraacetyllert glucosamin (4-Ac-G-HCl) (184,9 mg, 0,5 mmol) ble tilsatt og deretter ble reaksjonsblandingen omrørt ved romtemperatur 15 natten over. Vann (1 ml) ble tilsatt og reaksjonsblandingen omrørt i ytterligere 1 time ved romtemperatur. Reaksjonsblandingen ble inndampet under redusert trykk. Vann (5 ml) ble tilsatt, etterfulgt av kloroform (5 ml). Vannfasen ble separert og lyofilisert, hvilket gir et rtt mørke-brunt fast stoff. Det faste stoffet ble rensert ved kolonnekromatografi ved anvendelse av Sephadex G-50, hvilket gir kald Re-EC-G (128,4 mg, 65% utbytte). 20 Strukturen av kald Re-EC-G ble bekreftet ved H-1 og C-13 NMR og massespektrometri. Igjen oppviser Re-komplekset distinkt to foreldre-ioner med 40:60 forhold.

Element-analyse av kald Re-EC-G viste $\text{C}_{20}\text{H}_{35}\text{N}_4\text{O}_{13}\text{ReS}_2$ (C, H, N) med den beregnede verdi C:30,41, H:4,47, N:7,09; funnet verdi C:30,04, H:4,93, N:6,09. H-1 og C-13 NMR av kald Re-EC-G ligner det antatte ved NMR spektrometri. EC-G (5 mg) ble 25 merket med ^{99m}Tc (pertechnetat) (1 mCi) i nærvær av tinn(II) klorid (0,1 mg). HPLC analyse viste at kald Re-EC-G hadde en tilsvarende retensjonstid som ^{99m}Tc -EC-G.

EKSEMPEL 3

Syntese av EC-G Ved anvendelse av EC og glucosamin i en vandig reaksjon

EC (107 mg, 0,4 mmol) ble oppløst i NaHCO_3 (1N, 12 ml). Til denne fargeløse 30 løsning ble sulfo-N-hydroxysuccinimid (sulfo-NHS, 173,7 mg, 0,8 mmol) og 1-etyl-3-(3-dimetylaminopropyl) karbodiimid-HCl (EDAC) (Aldrich Chemical Co, Milwaukee, WI) (153,4 mg, 0,8 mmol) tilsatt. D-Glucosamin-hydrokloridsalt (Sigma Chemical Co., St

Louis, MO) (345 mg, 1,6 mmol) ble deretter tilsatt. En pH of 8 ble målt. Blandingen ble omrørt ved romtemperatur i 16 timer og deretter dialysert i 24 timer ved anvendelse av Spektra/POR molekylært porøst membran med "cut-off" ved 500 (Spektrum Medical Industries Inc., Houston, TX). Etter dialyse ble produktet filtrert med et 0,45 µm Nylon-
5 filter og deretter frysetørket ved anvendelse av en frysetørke (Labconco, Kansas City, MO). Råproduktet veiet 300-400 mg. H-1 NMR of EC-G viste lignende mønstre; imidlertid synes det som om blandingen ikke er så ren når sammenlignet med organisk EC-G. Element-analyse viste EC-G renhet på 63-77% ved anvendelse av forskjellige reaksjonsforhold mellom EC og glucosamin. Prep-HPLC (7,8 × 300 mm C-18 kolonne, Waters) (strømningshastighet: 0,5 ml/min, 100% vann, UV 235 nm) ble anvendt for å
10 rense råproduktet, 180-240 mg (utbytte 60%). H-1 og C-13 NMR av EC-G etter prep-HPLC viste ytterligere topper hvilket indikerer urenheter fra mono EC-G eller EC-glucosamin, sulfo-NHS og EDAC. Prep-HPLC rensning av den rå EC-G ga noen inkremental forbedring av kjemisk renhet; imidlertid, når den rå EC-G er merket med ^{99m}Tc i nærvær av tinn(II) klorid kan en radiochemisk renhet bedre enn 95% av ^{99m}Tc-EC-G
15 oppnås ved anvendelse av glukonat som en transchelator (som vist i radio-TLC og HPLC analyse).

EKSEMPEL 4

Cellulært opptaks-studium ved sammenligning av produkter syntetisert via den 20 vandige metode og den organisk metode

For ytterligere å validere EC-G biologisk aktivitet ble *in vitro* cellekulturforsøk utført. Kort ble cellulært opptak bestemt i tumorceller (50,000 celler/brønn) inkubert med ^{99m}Tc-EC-G (2 µCi/brønn) ved ulike tidsintervaller. De cellulære opptaksforsøk viste ingen markert forskjell mellom rå (urenset) EC-G og prep-HPLC rensset EC-G (FIG. 4) *In vitro* stabilitetsundersøkelser ble bestemt enten ved anvendelse av cellekulturer eller
25 oppløsning av EC-G i vann. Der ble en 10-15% reduksjon i cellulært opptak ved anvendelse av ^{99m}Tc-EC-G etter 2-4 uker. Den anvendbare levetiden for EC-G i vann synes å være 17,26 dager. *In vivo* avbildningsundersøkelser viste ingen markert forskjell mellom EC-G syntetisert fra vandige og organisk reaksjoner.

EKSEMPEL 5

Syntese av kald Re-EC-G ved anvendelse av Re-EC og glucosamin i en vandig reaksjon

Re-EC (255,8 mg, 0,5 mmol) (fra Eksempel 2) ble oppløst i NaOH (1N, 4,5 ml).
5 Satt til denne mørkt-blårødt-fargede løsning ble sulfo-NHS (217,1 mg, 1 mmol) og D-glucosamin-hydrokloridsalt (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) (431,3 mg, 2 mmol). 1-etyl-3-(3-dimetylaminopropyl)karbodiimid-HCl (EDAC) (Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI) (191,7 mg, 1 mmol) ble deretter tilsatt. pH ble målt større enn 8. Blandingen ble omrørt ved romtemperatur i 16 timer. Blandingen ble dialysert i 24 timer
10 ved anvendelse av Spektra/POR molekylært porøst membran med "cut-off" ved 500 (Spektrum Medical Industries Inc., Houston, TX). Etter dialyse ble produktet filtrert og deretter frysetørket ved anvendelse av en frysetørke (Labconco, Kansas City, MO). Råproduktet veide 276 mg. H-1 NMR av vandig Re-EC-G viste et lignende mønster; imidlertid synes det å være noe bevis på urenheter når sammenlignet med den organiske
15 Re-EC-G forbindelse. HPLC analyse av den organiske kalde Re-EC-G forbindelse viste én topp ved 272 nm; imidlertid hadde vandig kald Re-EC-G to topper. En av toppene i den vandige kalde Re-EC-G tilvarer den organisk kalde Re-EC-G forbindelse (topper 12,216 og 12,375, henholdsvis). De gjenværende topper var sulfo-NHS og andre mindre urenheter.

20

EKSEMPEL 6

Kvantitativt analyse av glucosamin (aktiv farmasøytisk bestanddel)

D-Glucosamin ble derivatisert for kolorimetriske forsøk. Kort, til en løsning av D-glucosamin-hydroklorid (25 g, 0,12 mol) i en nyfremstilt vandig løsning av 1N NaOH (120 ml) under omrøring ble *p*-anisaldehyd (17 ml, 0,14 mol) tilsatt. Etter 30 min., begynte
25 krystalliseringen og blandingen ble plassert i kjølekap natten over. Det utfelte produktet ble deretter filtrert og vasket med kaldt vann (60 ml), etterfulgt av en blanding av EtOH-et₂O (1:1), hvilket gir 2-deoksy-2-[*p*-metoksybenzyliden(amino)]-D-glucopyranose (D-glucosamin-anisaldehyd, 32,9408 g, 110,8 mmol, 95,5% utbytte) sm.p. 165-166 °C. H-1 NMR bekreftet strukturen.

30

Rå EC-G (50 mg) ble hydrolysert ved anvendelse av 1N NaOH. Anisaldehyd ble satt til reaksjonsløsningen. Etter 2 timer ble reaksjonsblandingen ekstrahert med

kloroform. Kloroformfasen, som inneholdt uomsatt anisaldehyd, ble inndampet under nitrogen. Vekten til det omsatte anisaldehydet ble anvendt for å bestemme mengden av glucosamin i D-glucosamin-anisaldehyd-addukt.

EKSEMPEL 7

5

Kvantitativt analyse av EC i EC-G

Rå EC-G (50 mg) ble hydrolysert ved anvendelse av 1N NaOH. Benzylklorid ble oppløst i dioksan (30 ml) og deretter tilsatt til den omrørte blandingen. Reaksjonsblandingen ble omrørt i 2 timer og deretter ekstrahert med kloroform. Kloroformfasen, som inneholdt uomsatt benzylklorid, ble inndampet under nitrogen. Vekten av omsatt benzylklorid ble anvendt for å bestemme mengden av EC i EC-G (Tabell 3).

EKSEMPEL 8

Kvantitativt analyse av sulfo-NHS og EDAC i EC-G

En standardkurve for sulfo-NHS ble opptatt ved UV 272 nm. Rå EC-G ble oppløst i vann. Fra standardkurven ble mengden av sulfo-NHS i EC-G bestemt ved UV 272 nm. Mengden av 1-etyl-3-(3-dimetylaminopropyl) karbodiimid-HCl (EDAC) ble beregnet ved å subtrahere EC, glucosamin og sulfo-NHS fra total EC-G vekt vist i Tabell 3.

EKSEMPEL 9

Kvantitativt analyse av glukose fosforyleringsforsøk

Ent *in vitro* heksokinaseforsøk ble anvendt for å bedømme glukosefosforyleringsprosessen til EC-G. Ved anvendelse av et sett (Sigma Chemical Company, MO) ble fluordeoksyglukose (FDG, 1,0 mg), EC-G (1,0 mg), D-glucosamin (G, 1,0 mg) og D-glukose (2,5 mg) oppløst i 1 ml (EC-G, G) eller 2,5 ml (D-glukose) vann. Derfra ble 200 µL fjernet og fortynnet i 2,5 ml vann. En 100 µL alikvot ble deretter fjernet og kombinert i løsning med 900 µL Infinity™ Glukose Reagens og inkubert ved 37 °C i tre min. Den fosforylerte glukose og NADH ble deretter bedømt ved en bølgelengde på 340 nm. Toppene av FDG (340 og 347 nm), glukose (301 og 342 nm), EC-G (303 og 342 nm) og G (302 og 342 nm) ble oppnådd.

EKSEMPEL 10

Kjemisk identitetsforsøk av glucosamin (aktiv farmasøytiske bestanddel) i EC-G
(syntetisert fra vandig reaksjon)

Et kolorimetrisk forsøk ble anvendt for å bestemme mengden av glucosamin. En
 5 løsnings av kobbersulfat (6,93 g i 100 ml vann) og natriumkaliumtartrat (34,6 g i 100 ml
 vann inneholdende 10 g NaOH) ble fremstilt. EC-G (25 mg) og glucosamin (standard) ble
 tilsatt med basisk kobbertartratløsning inntil ingen synlige tegn på kobberoksid-rød
 presipitat var å se. Mengden av glucosamin i EC-G ble 8,7 mg (35% vekt/vekt) bestemt
 fra titeringsvolum (Tabell 3).

10 Alternativt, som beskrevet i Eksempel 5, ble D-glucosamin-hydroklorid (25 g, 0,12
 mol) satt til en nyfremstilt vandig løsning av 1N NaOH (120 ml) under omrøring og
 deretter ble *p*-anisaldehyd (17 ml, 0,14 mol) satt til blandingen. Etter 30 min., begynte
 krystalliseringen og blandingen ble satt i kjøleskap natten over. Det utfelte produktet ble
 filtrert og vasket med kaldt vann (60 ml), etterfulgt av en blanding av EtOH-et₂O (1:1),
 15 hvilket gir 2-deoksy-2-[*p*-metoksybenzyliden(amino)]-D-glucopyranose (D-glucosamin-
 anisaldehyd, 32,9408 g, 110,8 mmol, 95,5% utbytte) sm.p. 165-166 °C. Rå EC-G (50 mg)
 ble hydrolysert ved anvendelse av 1N NaOH. Anisaldehyd ble satt til reaksjonsløsningen.
 Etter 30 min., begynte krystalliseringen og blandingen ble satt i kjøleskap natten over. Det
 utfelte produktet ble filtrert og vasket med kaldt vann og smeltepunktet ble bestemt til 165-
 20 166 °C (inneholdende 18 mg glucosamin).

TABELL 3

Kvalitativ analyse av glucosamin og EC i
EC-G (syntetisert fra vandig reaksjon)

Teoretisk Verdi

Forbindelse	Molekylvekt	Prosentdel (vekt/vekt)	
		(100%)	(65%)
EC-G	591		
EC	268		
Glucosamin (G)	179		
EC i EC-G		39% (234/591)	25%
G i EC-G		60% (356/591)	39%

Eksperimentell verdi

Forbindelse	Prosentdel (vekt/vekt)	Metode
EC i EC-G	30%	kolorimetrisk
G i EC-G	35%	kolorimetrisk
Sulfo-NHS i EC-G	34%	UV (268 nm)
EDAC	1%	beregning

EKSEMPEL 11

5 **Kjemisk identitetsforsøk for etylendicystein (chelator) i EC-G (syntetisert med vandig reaksjon)**

To metoder ble anvendt for å bestemme renheten av EC-G. I de første metode ble et kolorimetrisk forsøk anvendt for å bestemme mengden av EC. En løsning av jod (0,1 mol/L) (13 g sammen med 36 g KI i 1000 ml vann) ble fremstilt og EC-G (25,2 mg) og EC (25 mg) (standard) ble satt til jodløsningen. I standard EC ble et blekhvitt fast stoff utfelt, mens intet presipitat ble sett i EC-G. En titreringsmetode ble anvendt (gulaktig farge (vedvarer mer enn 5 min.)) for å bestemme mengden av EC i EC-G. Hver 1 ml jod løsning som ble anvendt tilsvarer 13,4 mg EC. Mengden av EC i EC-G var 7,6 mg (30,2% vekt/vekt).

15 I den annen metode ble måling av smeltepunktet til et tiol-EC-G addukt utført. Eksempel 1 beskrevet syntesen av S,S'-bis-benzyl-N,N'-etylendicystein (Bz-EC). Kort ble EC (2,684 g, 10 mmol) oppløst i 1N NaOH (40 ml). Benzylklorid (5,063 g, 40 mmol) ble oppløst i dioksan (30 ml) og satt til en omrørt blanding. Etter 30 min., ble pH i løsningen justert til 2 med konsentrert HCl. Fellingen ble filtrert og vasket med vann og omkrystallisert fra trifluoreddiksyre. Utbyttet var 79,0% (3,5454 g), sm.p. 227-229 °C (dec.) (oppgett 229-230 °C). Rå EC-G (50 mg) ble deretter hydrolysert ved anvendelse av 1N NaOH og benzylklorid (40 mg) ble tilsatt. Reaksjonsblandingen ble omrørt i 30 min. pH i løsningen ble justert til 2 med konsentrert HCl. Fellingen ble filtrert og vasket med vann, hvilket gir EC-benzyl-addukt, sm.p. 227-229 °C (inneholdende EC 16 mg).

EKSEMPEL 12

Kjemisk identitetsforsøk for sulfo-N-hydroksysuccinimid (sulfo-NHS) i EC-G (syntetisert med vandig reaksjon)

Forsøket for N-hydroksysulfosuccinimid (sulfo-NHS) ble bestemt ved UV (268
5 nm). En standardkurve for sulfo-NHS ble produsert ved UV 268 nm. Ved denne UV-
absorbans, ble dårlig absorbans observert både for EC-G og EDAC. Rå EC-G (50 µg/ml)
ble oppløst i vann og absorbansen ble målt ved 268 nm. Den beregnede sulfo-NHS var
35±5% (vekt/vekt).

EKSEMPEL 13

Radiokjemisk renhets og identitetsforsøk

Tynn-sjikt kromatografi (TLC) og høy ytelse væskechromatografi (HPLC) ble
anvendt for å bestemme radiokjemisk identitet. For TLC forsøket ble både vandig og
organisk syntetisert EC-G merket med ^{99m}Tc og applisert på en TLC stripe impregnert med
silikagel kolonnemateriale (ITLC-SG) og scannet ved anvendelse av en radio-TLC
15 scanner. Retensjonsfaktor (Rf) verdier for ^{99m}Tc-EC-G (fra den vandige syntese) og
referansestandard (^{99m}Tc-EC-G fra organisk syntese) ble 0,8 (bestemt ved
ammoniumacetat (1M):metanol; 4:1) eller saltløsning. For HPLC forsøket ble den
kjemiske renhet av organisk- og vandig syntetisert EC-G henholdsvis 95,64% og 90,52%.
EC-G syntetisert fra den organiske reaksjonen var renere enn EC-G syntetisert fra den
20 vandige reaksjonen. Både den organisk og vandig syntetiserte EC-G ble merket med ^{99m}Tc
og lastet (20 µL, 1 mg/ml EC-G) på en C-18 omvendt fase kolonne (Waters, semi-prep, 7,8
× 300 mm). Retensjonstids (Rt) verdier for ^{99m}Tc-EC-G og kald Re-EC-G
(referansestandard fra organisk syntese) var mellom 11,7-13,5 min. (bestemt ved 100%
vann @ 0,5 ml/min, UV ved 210 nm). Både den organisk og vandig syntetiserte ^{99m}Tc-
25 EC-G ble detektert med UV bølgelengde (210 nm) og de matchende radioaktive
detektorfunn var innenfor de ovenfor angitt områder. *In vitro* cellekulturforsøk viste at Re-
EC-G ga en doserespons kurve (FIG. 3) og var effektiv mot humane lymfom celler.

Oppsummering:

- Den radiokjemiske renhet av ^{99m}Tc-EC-G målt ved HPLC og TLC er større enn
30 95% for vandig syntetisert EC-G, som nær den radiokjemiske renhet for den
organisk syntetiserte EC-G.

- 5 ▪ Den kjemiske renhet forumerket vandig EC-G målt ved kolorimetrisk og element-analyse er i området 60-70%. Alle urenheter inneholdt i EC-G forbindelsen (vandig eller organisk syntese) er klart identifisert gjennom kolorimetriske forsøk og UV spektrometri som glucosamin (35%), EC (30%), sulfo-NHS (34%) og EDAC (1%) på en % vekt/vekt basis.
- Når målt ved HPLC ved UV 210 nm sammenlignes den kjemiske renhet av umerket vandig EC-G meget fordelaktig med umerket organisk EC-G ved henholdsvis 90,52% vs. 95,64%.
- 10 ▪ Retensjonstiden for vandig ^{99m}Tc-EC-G er i området til kald Re-EC-G målt ved HPLC ved 272 nm.
- NMR (¹H, ¹³C) av vandig EC-G er i området for kald Re-EC-G.
- Umerkede organisk EC-G, merkede organisk EC-G og kald Re-EC-G anvendes som referansestandarder.
- 15 ▪ Biologiske forsøk (*in vitro* opptak og *in vivo* avbildning) viste ingen markerte forskjeller mellom vandig og organisk syntetisert EC-G.

EKSEMPEL 14

Renhetsanalyse av ⁶⁸Ga-EC-G

20 ⁶⁸Ga-EC-G syntetisert ved både organiske og vandige metoder ble analysert via radio-TLC. FIG. 6 viser den forbedrede renhet av det organiske produktet (a) over vandig produkt (b). FIG. 7 representerer rensning utført på en C-18 kolonne (Puresil, 4,6x150 mm, Waters, Milford, MA) og eluert med vann ved anvendelse av en strømningshastighet på 0,5 ml/min. Deteksjon ble utført via UV og NaI.

EKSEMPEL 15

Stabilitetsanalyse av ⁶⁸Ga-EC-G

25 FIG. 8 viser resultatene av en undersøkelse av stabiliteten til ⁶⁸Ga-EC-G i hundeserum som vist ved radio-TLC. 100 µL ⁶⁸Ga-EC-G (0,7 mg/0,7 ml, pH 7,5, 865 µCi) ble satt til 100 µL hundsserum og inkubert i 0, 30, 60 og 120 minutter. Videre ble 200 µL MeOH satt til hver prøve og vortekset ("vortexed") før eluering ved anvendelse av et system omfattende pyridin:EtOH:vann = 1:2:4; Whatman #1 papir. (a) ⁶⁸Ga-EC-G (0,7

mg/0,7 ml, pH 7,5, 865 μ Ci); (b) 100 μ L 68 Ga-EC-G i 100 μ L hundeserum, time = 0; (c) time = 30 min.; (d) time = 60 min.; (e) time = 120 min.; (f) 68 Ga-EC-BSA.

FIG. 9 viser resultatene av en undersøkelse av stabiliteten til 68 Ga-EC-G i hundeserum som analysert i et protein-bindingsforsøk. En kontrollprøve ble inkubert med 68 Ga-EC-bovint serumalbumin (BSA) i hundsserum. 100 μ L 68 Ga-EC-G (0,7 mg/0,7 ml, pH 7,5, 865 μ Ci) ble satt til 100 μ L hundeserum og inkubert i 0, 30, 60 og 120 minutter, aktiviteten tellet, og deretter ble 200 μ L MeOH tilsatt og prøven vortekset, sentrifugert i 1 minutt og deretter ble supernatant og presipitat hver tellet. Tellingene bestemt i utfellingen er indikativ for graden av binding mellom 68 Ga-EC-G og proteiner i hundeserum.

Proteinbindingshastigheten økte fra 18,6% til 51,5% etter 2 timer, hvilket indikerer det målsøkende potensiale til 68 Ga-EC-G.

EKSEMPEL 16

In Vitro oppdaterende undersøkelse av 68 Ga-merkede forbindelser i brystkreftcellelinje 13762

FIG. 10 viser resultater fra en *in vitro* opptaksundersøkelse av 68 Ga-merkede forbindelser i brystkreftcellelinje 13762. Cellulært opptak av 68 Ga-EC og 68 Ga-EC-G i 13762 celler (1 μ Ci/50,000 celler pr. brønn). Cellulært opptak av 68 Ga-EC-G ble betydelig ($p < 0,01$) høyere enn kontroll 68 Ga-EC ved 0,5-2 timer.

EKSEMPEL 17

Avbildning av kardiovaskulær sykdom

FIG. 11 viser planare scintigrafibilder av et 99m Tc-EC-ESMOLOL derivat (300 μ Ci/rat) i bryst tumor-bærende rotter. Antallene er hjerte/øvre mediastinum (H/UM) tellingstetthet (telling/pixel) forhold ved 15-45 minutter. Linjeprofilen i FIG. 11 viser en høy hjerte-region tellinger/pixels-forhold sammenlignet med sideveis ("laterally") lokalisert vev. Disse resultater demonstrerer at 99m Tc-EC-ESMOLOL er overraskende effektive ved avbildning av hjerte-regionen. FIG. 12 viser 68 Ga-EC-TML PET avbildning resulterer i en New Zealand hvit kanin. En kanin ble administrert 68 Ga-EC-trimetyl lysin (EC-TML). PET koronale bilder ble ervervet ved 45 minutter etter injeksjon av 0,66 mCi av 68 Ga-EC-TML (rygg til buk nivå ("dorsal to ventral order")). Høyt opptak i hjertet ble bemerket, hvilket indikerer at EC-TML ble involvert i fettsyremetabolismen.

EKSEMPEL 18

Ikke-begrensende eksempel på organisk syntese av Ec-G via et EC-benzhydrol-Cbz-glucosamin mellomprodukt (se FIG. 13)

EC-benzhydrol-Cbz-Glucosamin kan oppløses i etylacetat og felles ut ved tilsetning av MTBE eller n-heksan. Dette ble forutsett som en metode for å oppnå rene penultimate specier i en metode for å oppnå EC-G. Renheten (HPLC) av EC-benzhydrol-Cbz-Glucosamin før denne utgnidningsbehandling var ca. 64%. Etter utgnidning ble renheten ca. 68% (MTBE) eller 65%-80% (n-heksan). En annen forutsett metode for rensning av produktet er gjennom anvendelse av en biotage-patron, siden silikagelen i disse patroner er mer aktiv enn flash kvalitet silikagel.

Andre renseteknikker og prosedyrer ble også forsøkt ved anvendelse av ulike løsningsmiddelsystemer som et alternativ til kromatografi, hvilke resultater er vist i Tabell 4 nedenfor. Utfelling ble forsøkt i forskjellig løsningsmiddelsystemer. EC-benzhydrol-Cbz ble oppløst i et valgt løsningsmiddel (A) og langsomt ladet til et større volum av medløsningsmiddel (B). Imidlertid indikerer ikke resultatene at denne fremgangsmåte ville være like effektive som andre metoder, ettersom renhetsendringene var neglisjerbare. Utgnidningsmetoder ble også forsøkt ved anvendelse av de valgte løsningsmiddelsystemer i forskjellige forhold for utfelling. Resultatene for utgnidningsforsøkene antyder at materialet ikke er rent nok for visse applikasjoner. Kolonnekromatografi ble også forsøkt og betingelsene ble modifisert fra uken før (15:1 silika: rå, lastet tørr på silika). Denne metoden tillater moderat opprensing av materialet (fra 55A% til 75A%).

TABELL 4

EC-benzyhydrol-Cbz rensning ved utfelling og utgnidning

Løsningsmiddel A	Løsningsmiddel B	Utfellingsresultat	Utgnidningsresultat
Etylacetat	Heksan	Klebrig fast stoff	Oil
Metanol	Vann	Klebrig olje	Oil
DCM	Heksan	Klebrig olje	Oil
Etanol	Vann	Klebrig olje	Oil

REFERANSER

- U.S. Patent 5,605,672
 U.S. Patent 6,692,724
 5 U.S. Patent 6,737,247
 U.S. Patent Søknad 09/599,152
 U.S. Patent Søknad 10/627,763
 U.S. Patent Søknad 10/672,142
 U.S. Patent Søknad 10/703,405
 10 U.S. Patent Søknad 10/732,919
- Alauddin og Conti, *Nucl. Med. Biol.*, 25(3):175-180, 1998.
 Alauddin *et al.*, *Nucl. Med. Biol.*, 23:787-792, 1996.
 Alauddin *et al.*, *Nucl. Med. Biol.*, 26:371-376, 1999.
 15 Alberico *et al.*, *Surg. Oncol. Clin. N. Am.*, 13(1):13-35, 2004.
 Angello *et al.*, *Am. J. Cardiol.*, 60:528-533, 1987.
 Benveniste og Davies, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70(8):2276-2280, 1973.
 Blondeau *et al.*, *Can. J. Chem.*, 45:49-52, 1967.
 Bodansky, I: *Peptide Chemistry*, 2nd ed., Springer-Verlag, New York, 1993.
 20 Bolhuis *et al.*, *Int. J. Cancer Suppl.*, 7:78-81, 1992.
 Borodina *et al.*, *Appl. Environ. Microb.*, 71(5):2294-302, 2005.
 Bush *et al.*, *Br. J. Cancer Suppl.*, 37(3):302-306, 1978.
 Campbell *et al.*, *Cancer Res.*, 51(19):5329-5338 1991.
 Canevari *et al.*, *Hybridoma*, 12(5):501-507, 1993.
 25 Chasselle *et al.*, *Lancet*, 34B:143, 1995.
 Coney *et al.*, *Cancer Res.*, 54(9):2448-2455, 1994.
 Diamond *et al.*, *J. Biol. Chem.* 253(3):866-871, 1978.
 Dische, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 20(1):147-152, 1991.
 Franklin *et al.*, *Int. J. Cancer Suppl.*, 8:89-95, 1994.
 30 Gambhir *et al.*, *J. Nucl. Med.*, 39(11):2003-2011, 1998.
 Gambhir *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96(5):2333-2338, 1999.
 Gambhir *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:2785-2790, 2000.

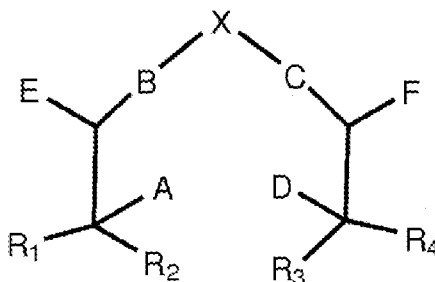
- Gatenby *et al.*, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 14(5):831-838, 1988.
- Ginobbi *et al.*, *Anti-cancer Res.*, 17(1A):29-35, 1997.
- Grant, I: *Synthetic Peptides*, Freeman & Co., New York, 1992.
- Gray *et al.*, *Nature*, 182(4640):952-953, 1958.
- 5 Grønn og Wuts, I: *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, New York, 1999.
- Gutman *et al.*, *Am. Heart J.*, 106: 989-995, 1983.
- Hall *et al.*, *Radiat. Res.*, 114(3):415-424, 1988.
- Henson *et al.*, *AJNR Am. J. Neuroradiol.*, 25(6):969-972, 2004.
- 10 Hoelscher *et al.*, *Spine*, 25(15):1871-7, 2000.
- Holm, *et al.*, *APMIS*, 102(11):828-836, 1994.
- Hostetler og Hall, *PNAS*, 79:1663-1667, 1982.
- Hsueh og Dolnick, *Biochem. Pharmacol.*, 45(12):2537-2545, 1993.
- Hu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:9791-95, 1998.
- 15 Iyer *et al.*, *J. Nucl. Med.*, 42(1):96-105, 2001.
- Koh *et al.*, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 22:199-212, 1992.
- Kranz *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 92(20):9057-61, 1995.
- Kundra *et al.*, *J. Nucl. Med.*, 43(3):406-412, 2002.
- Leamon og Lav, *Biochem. J.*, 291 (Pt 3):855-60, 1993.
- 20 Leamon og Lav, *J. Biol. Chem.*, 267(35):24966-71, 1992.
- Leamon og Lav, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88(13):5572-76, 1991.
- Lee og Lav, *J. Biol. Chem.*, 269(5):3198-3204, 1994.
- Martin *et al.*, *J. Nucl. Med.*, 30:194-201, 1989.
- Medisinsk Letter, 34:78, 1992.
- 25 Michalik *et al.*, *Pharmacol Res.* 21(4):405-414, 1989.
- Murakami *et al.*, *J Orthop Res.*, 14(5):742-8, 1996.
- Murakami *et al.*, *Bone*, 21(5):411-418, 1997.
- Myszka *et al.*, *Carb. Res.*, 338:133-141, 2003.
- Nakae og Nakae, *Antimicrobial Agents and Chemo.*, Okt;22(4):554-59, 1982.
- 30 Namavari *et al.*, *Nucl. Med. Biol.*, 27(2):157-62, 2000.
- Nordmark *et al.*, *Radiother. Oncol.*, 41(1):31-39, 1996.
- Orr *et al.*, *J. Natl. Cancer Inst.*, 87(4):299-303, 1995.
- Ozmen *et al.*, *Drug Chem Toxicol.*, 28(4):433-45, 2005.

- Patrick *et al.*, *J. Neurooncol.*, 32(2):111-23, 1997.
- Pohost *et al.*, *Circulation*, 55:294-302, 1977.
- Rasey *et al.*, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 17(5):985-91, 1989.
- Rasey *et al.*, *Radiother. Oncol.*, 17(2):167-73, 1990.
- 5 Remington's Pharmaceutical sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1289-1329, 1990.
- Ross *et al.*, *Cancer*, 73(9):2432-43, 1994.
- Saha *et al.*, *Semin. Nucl. Med.*, 24(4):324-49, 1994.
- Strunk og Schild, *Eur. Radiol.*, 14(6):1055-1062, 2004.
- 10 Tachibana *et al.*, *Biochem. Pharmacol.*, 25(20):2297-301, 1976.
- Tod *et al.*, *Clin Pharmacokinet.*, Mar;38(3):205-223, 2000.
- Tjuvajev *et al.*, *J. Nucl. Med.*, 43(8):1072-1083, 2002.
- Valk *et al.*, *J. Nucl. Med.*, 33(12):2133-2137, 1992.
- Verbruggen *et al.*, *J. Nucl. Med.*, 33:551-557, 1992.
- 15 Warrell, Jr *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 329(3):177-189, 1993.
- Weitman *et al.*, *Cancer Res.*, 52(12):3396-3401, 1992b.
- Weitman *et al.*, *Cancer Res.*, 52(23):6708-6711, 1992a.
- Weitman *et al.*, *J Neurooncol.*, 21(2):107-112, 1994.
- Westerhof *et al.*, *Cancer Res.*, 51(20):5507-5513, 1991.
- 20 Yaghoubi *et al.*, *J. Nucl. Med.*, 42:1225-1234, 2001.
- Yanai *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103(25):9661-9666, 2006.
- Yang *et al.*, *Diabetes*, 53:67-73, 2004.

PATENTKRAV

1. Fremgangsmåte for syntetisering av et chelator-målligand-konjugat, hvor fremgangsmåten omfatter trinnet:

5 (a) konjugering, i et organisk medium, av en chelator med formelen:



- til minst én målligand som omfatter minst én funksjonell gruppe, hvor
- 10 chelatoren er etylendicystein (EC), og hvor de to tiolgruppene og de to aminogruppene av etylendicystein er beskyttet; dvs. hvor:
- A og D er hver et beskyttet tiol;
 - B og C er hver et tertært amin;
 - E og F er hver -COOH;
 - 15 - R₁, R₂, R₃ og R₄ er hver H;
 - X er -CH₂-CH₂-; og
 - konjugeringen er mellom A, D, E eller F av chelatoren og minst én ubeskyttet funksjonell gruppe av hver målligand;
 - minst én av A, D og målliganden omfatter en beskyttet funksjonell gruppe,
 - 20 - minst én funksjonell gruppe av målliganden er ubeskyttet,
 - målliganden er et middel som etterligner glukose.

2. Fremgangsmåten ifølge krav 1, hvor det organiske mediet omfatter et polart eller et upolart løsningsmiddel, særlig hvor det organiske mediet omfatter

25 dimetylformamid, dimetylsulfoksid, dioksan, metanol, etanol, heksan, metylenklorid, acetonitril, tetrahydrofuran, eller en blanding derav.

3. Fremgangsmåten ifølge krav 1, hvor fremgangsmåten videre omfatter minst ett rensingstrinn (b), hvor rensingstrinnet (b) omfatter

silikagelkolonnekromatografi, HPLC, eller en kombinasjon derav, hvor fremgangsmåten eventuelt videre omfatter et hvilket som helst av følgende trinn:

(c) chelatering av et metallion til chelatoren for å danne et metallion-merket konjugat mellom chelatoren og midlet som etterligner glukose, og

5 (d) fjerning av hver beskyttende gruppe i ett eller flere trinn.

4. Fremgangsmåten ifølge krav 3, hvor fremgangsmåten omfatter trinnene (b) og (d) og videre omfatter trinnet

(e) chelatering av et metallion til chelatoren for å danne et metallion-merket

10 konjugat mellom chelatoren og midlet som etterligner glukose,

særlig hvor genereringen av det metallion-merkede konjugatet omfatter trinnene:

(f) fjerning av minst én beskyttende gruppe fra konjugatet; og

(g) chelatering av et metallion til chelatoren til konjugatet, eller

15 fremgangsmåten videre omfatter trinnene:

(h) chelatering av et metallion til chelatoren for å danne en metallion-merket chelator;

(i) konjugering av den metallion-merkede chelatoren til et middel som etterligner glukose; og

20 (j) fjerning av minst én beskyttende gruppe fra det metallion-merkede konjugatet mellom chelatoren og midlet som etterligner glukose.

5. Fremgangsmåten ifølge krav 4, hvor metallionet er et technetiumion, et kobberion, et indiumion, et thalliumion, et galliumion, et arsenion, et rheniumion, et

25 holmiumion, et yttriumion, et samariumion, et selenion, et strontiumion, et

gadoliniumion, et vismution, et jernion, et manganion, et lutetiumion, et koboltion, et platinaion, et kalsiumion eller et rhodiumion, eller hvor metallionet er et

radionuklid som ^{99m}Tc , ^{188}Re , ^{187}Re , ^{186}Re , ^{153}Sm , ^{166}Ho , ^{90}Y , ^{89}Sr , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{111}In , ^{183}Gd , ^{59}Fe , ^{225}Ac , ^{212}Bi , ^{211}At , ^{45}Ti , ^{60}Cu , ^{61}Cu , ^{67}Cu , ^{64}Cu og ^{62}Cu .

30

6. Fremgangsmåten ifølge krav 5, hvor fremgangsmåten videre omfatter trinnet

(k) tilsetning av et reduksjonsmiddel.

7. Fremgangsmåten ifølge krav 1, hvor den minst ene funksjonelle gruppen av midlet som etterligner glukose, omfatter O, N, S og P, særlig hvor den minst ene funksjonelle gruppen er en amino-, en amido-, en tiol-, en hydroksyl-, en eter-, en ester-, en karbonyl-, en karboksylsyre-, en sulfonamido-, en tioeter-, en 5 tioester- eller en tiokarbonylgruppe.
8. Fremgangsmåten ifølge krav 1, hvor (i) hvilke som helst tre eller fire av A, B, C og D sammen danner et N_2S_2 -chelate, eller (ii) A og D er beskyttede tioler beskyttet av et alkylhalogenid, et benzyhalogenid, et benzoylhalogenid, et sulfonylhalogenid, 10 et trifenylmetylhalogenid, et metoksytrifenylmetylhalogenid eller cystein.
9. Fremgangsmåten ifølge krav 1, hvor konjugatet mellom chelatoren og midlet som etterligner glukose, videre omfatter en linker mellom chelatoren og midlet som etterligner glukose, særlig hvor linkeren er et peptid, glutaminsyre, 15 asparaginsyre, brometylacetat, etylendiamin, lysin, eller en hvilken som helst kombinasjon av én eller flere av disse gruppene, eller hvor chelatoren er konjugert til mer enn ett middel som etterligner glukose.
10. Fremgangsmåten ifølge krav 1, hvor midlet som etterligner glukose, er 20 deoksyglukose, glukosamin, tetraacetyliert glukosamin, neomycin, kanamycin, gentamycin, paromycin, amikacin, tobramycin, netilmycin, ribostamycin, sisomycin, micromycin, lividomycin, dibekacin, isepamycin, astromycin eller aminoglykosid,
11. Fremgangsmåten ifølge krav 1 eller 10, hvor i formelen ifølge krav 1 25
- A og D er benzhydrylbeskyttede tiolgrupper,
 - B og C er Cbz--beskyttede sekundære aminogrupper (-NH-),
 - E og F er hver -COOH;
 - R_1 , R_2 , R_3 og R_4 er hver H;
 - X er -CH₂-CH₂-,
- 30 - konjugeringen er mellom E og F (begge -COOH) og to ubeskyttede primære aminogrupper av to målligander, hvor målligandene er to midler som etterligner glukose, og midlene som etterligner glukose, er hver ubeskyttede glukosaminer,

hvor det organiske mediet er DMF, og hvor, etter utførelse av konjugeringsreaksjonen, de beskyttende gruppene på A til D fjernes ved å utsette det intermediære konjugatet for Na/NH₃ for å oppnå det ubeskyttede konjugatet (EC-G).

- 5 12. Forbindelse til anvendelse i en fremgangsmåte for å diagnostisere en sykdom, eller behandle en sykdom, hvor forbindelsen er et konjugat mellom en chelator og et middel som etterligner glukose, hvor midlet som etterligner glukose, omfatter glukosamin eller deoksyglukose, og hvor chelatoren og midlet som etterligner glukose, er konjugert via en amidbinding eller en esterbinding,
- 10 hvor forbindelsen er oppnåelig ved fremgangsmåten i krav 1 eller 3 (med trinnene (b) og (d)), hvor konjugatet er merket med et metallion valgt fra ^{99m}Tc, ⁶⁸Ga, ¹⁸⁸Re, platina og ¹⁸⁷Re, og hvor renheten av konjugatet er mellom ca. 70 % (vekt/vekt) og ca. 99,9 % (vekt/vekt), særlig hvor renheten av konjugatet er mellom ca. 80 % (vekt/vekt) og ca. 99,9 % (vekt/vekt) eller mellom ca. 90 %
- 15 (vekt/vekt) og ca. 99,9 % (vekt/vekt), og hvor sykdommen som skal diagnostiseres eller behandles, er myokardinfarkt, myokardiskemi, kongestiv hjertesvikt, kardiomyopati, valvulær hjertesykdom, arytmi eller angina pectoris.
13. Forbindelse til anvendelse ifølge krav 12, hvor metallionet er et
- 20 radionuklid, eller hvor anvendelsen er i et menneske.
14. Forbindelse til anvendelse ifølge krav 12, hvor fremgangsmåten for å diagnostisere en sykdom omfatter avbildning av et sted ved bruk av PET, PET/CT, CT, SPECT, MR, SPECT/CT, optisk avbildning eller ultralyd.
- 25 15. Forbindelse til anvendelse ifølge krav 12, hvor fremgangsmåten for å diagnostisere en sykdom omfatter avbildning av et hjerte.
16. Forbindelse til anvendelse ifølge krav 12, hvor anvendelsen er en
- 30 fremgangsmåte for å diagnostisere en sykdom som omfatter avbildning av hjertet, og sykdommen er myokardinfarkt, myokardiskemi eller angina pectoris.

17. Forbindelse til anvendelse ifølge krav 12, hvor den metallion-merkede forbindelse er ^{99m}Tc -EC-glukosamin, ^{188}Re -EO-glukosamin eller ^{187}Re -EO-glukosamin.

- 5 18. Fremgangsmåte for avbildning av hjertet til en person som det er administrert en forbindelse til,

hvor forbindelsen er et konjugat mellom en chelator og et middel som etterligner glukose, hvor midlet som etterligner glukose, omfatter glukosamin
10 eller deoksyglukose, og hvor chelatoren og midlet som etterligner glukose, er konjugert via en amidbinding eller en esterbinding, hvor forbindelsen er oppnåelig ved fremgangsmåten i krav 1 eller 3 (med trinnene (b) og (d)), hvor konjugatet er merket med et metallion valgt fra ^{99m}Tc , ^{68}Ga , ^{188}Re , platina og ^{187}Re , og hvor renheten av konjugatet er mellom ca. 70 % (vekt/vekt) og ca.
15 99,9 % (vekt/vekt), særlig hvor renheten av konjugatet er mellom ca. 80 % (vekt/vekt) og ca. 99,9 % (vekt/vekt) eller mellom ca. 90 % (vekt/vekt) og ca. 99,9 % (vekt/vekt), og hvor fremgangsmåten omfatter avbildning av hjertet.

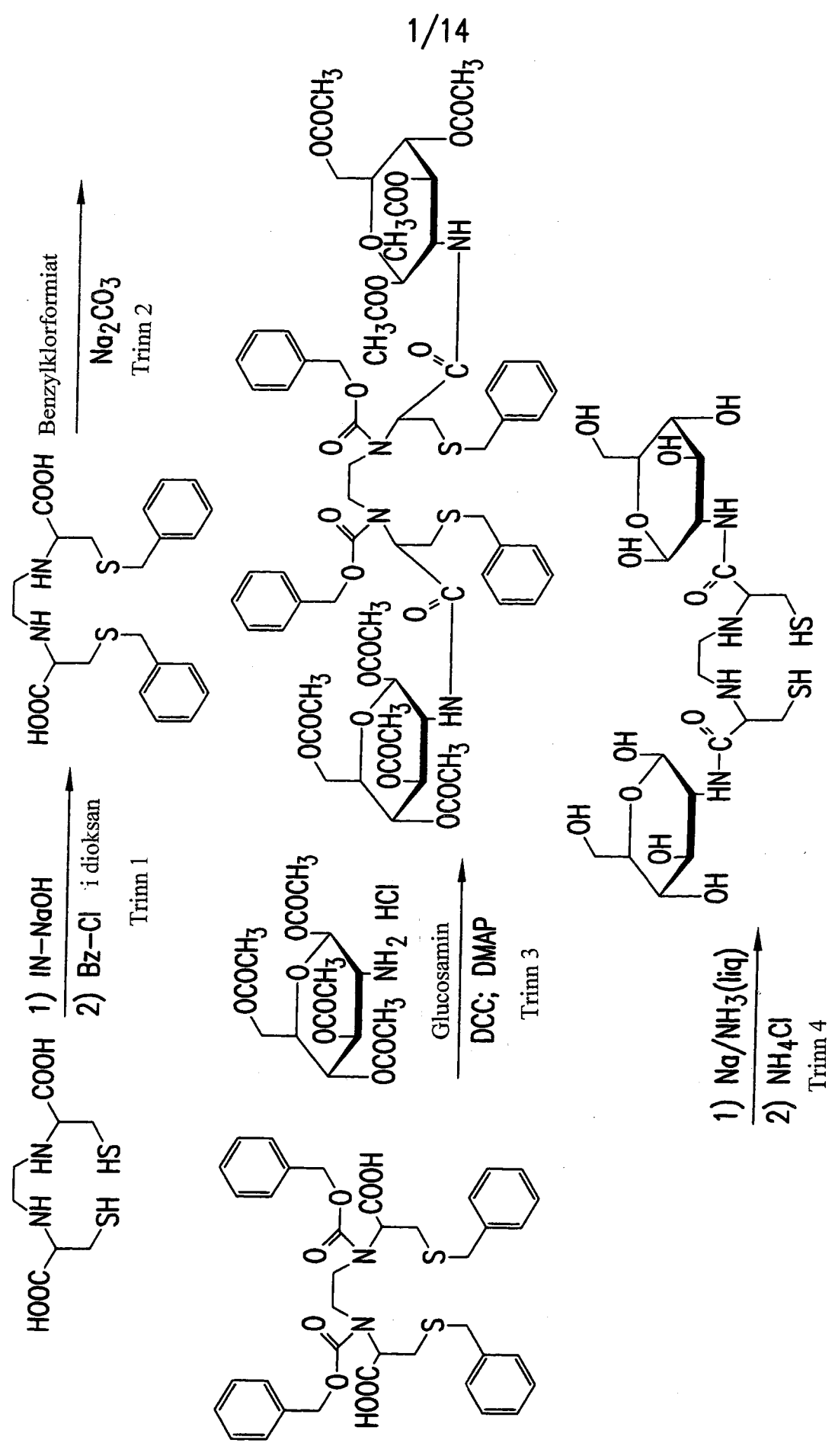


FIG. 1

2/14

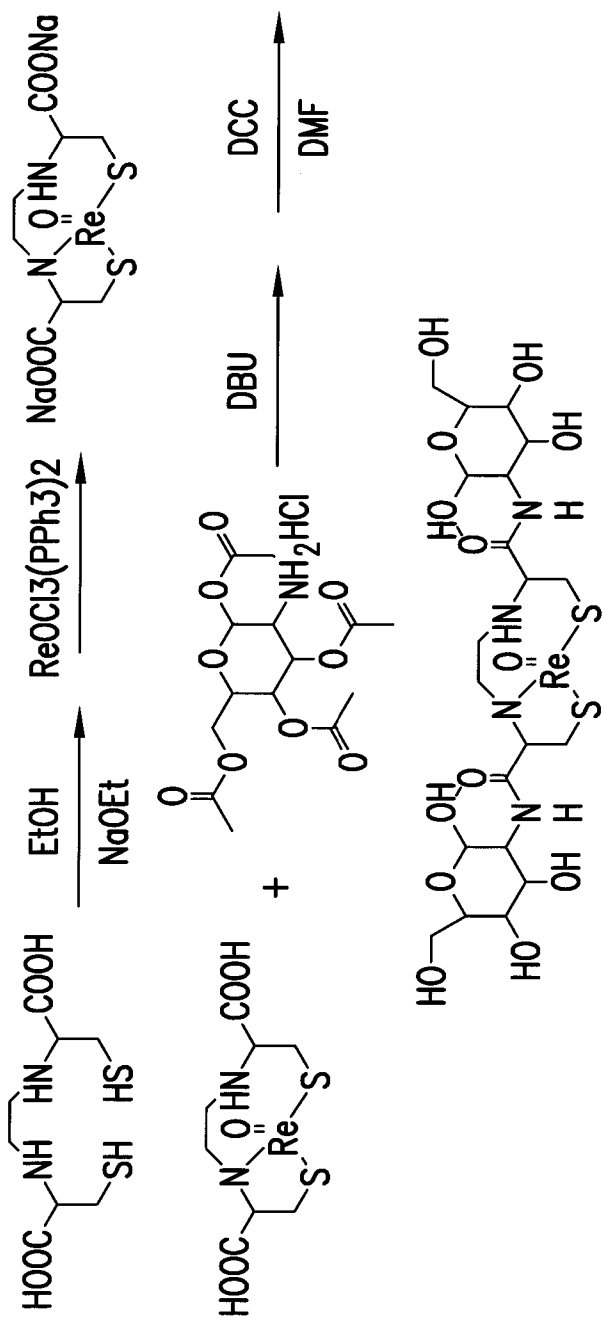


FIG. 2

3/14

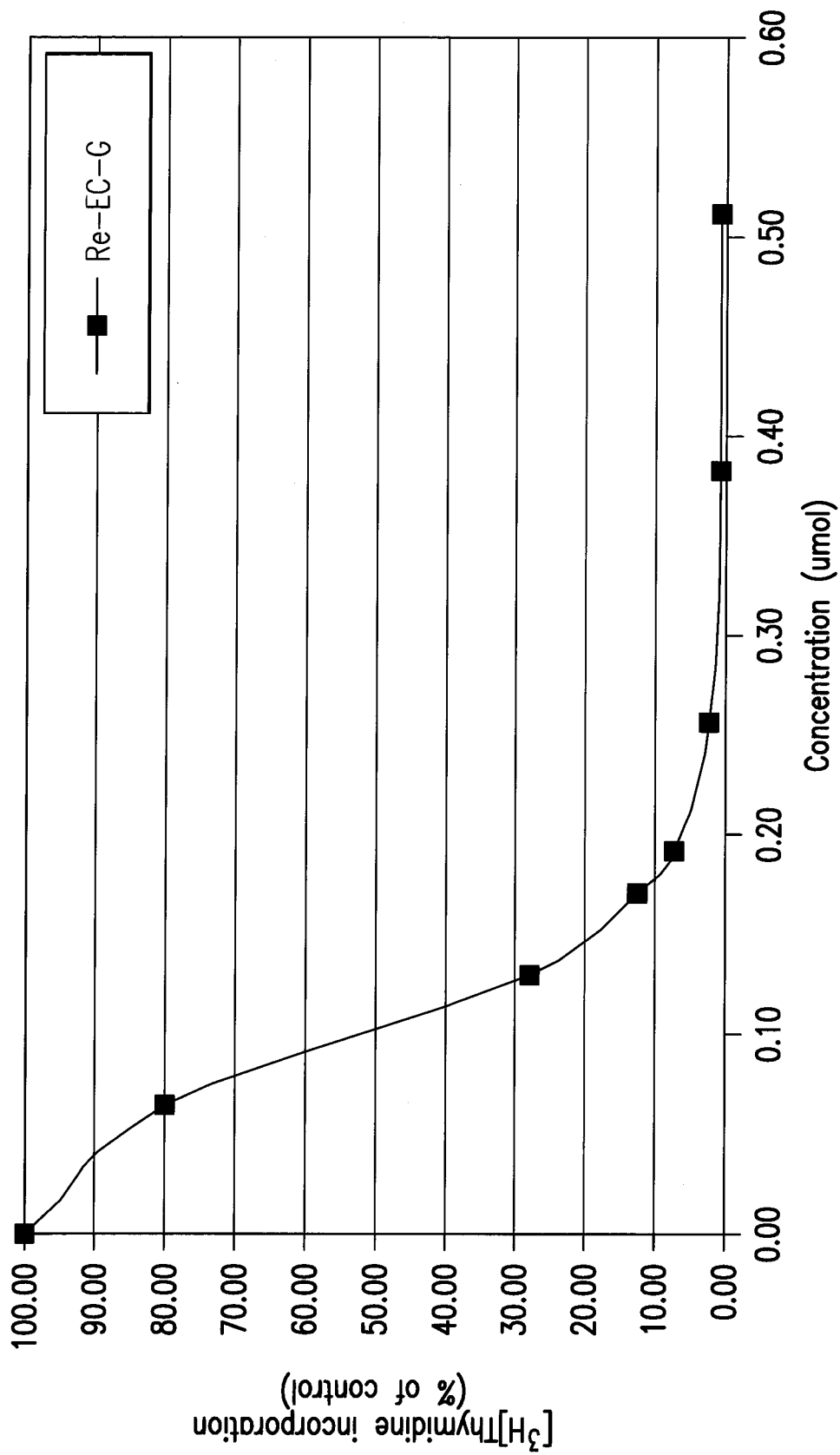


FIG.3

4/14

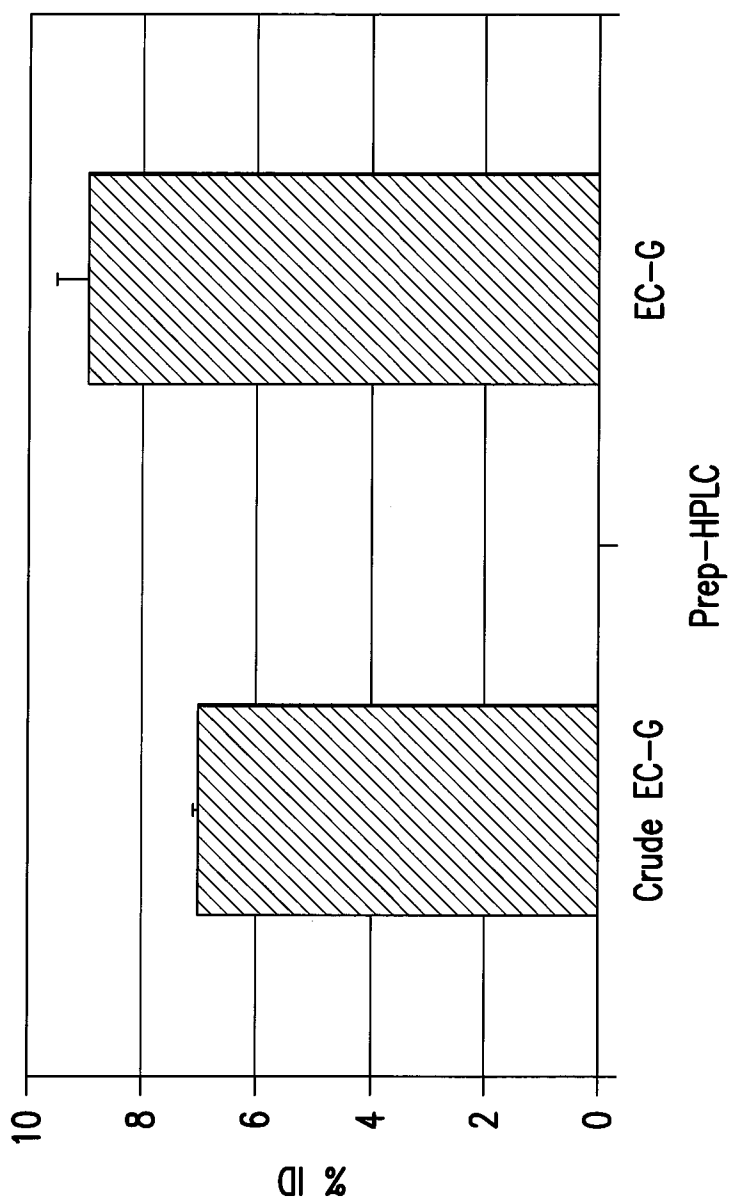


FIG.4

ECDG (1)
 MF: C₂₀H₃₈N₄O₁₂S₂
 [M + H]⁺ m/z_{calc.}: 591.2006

1:TOF MS ES+
 1.20e3

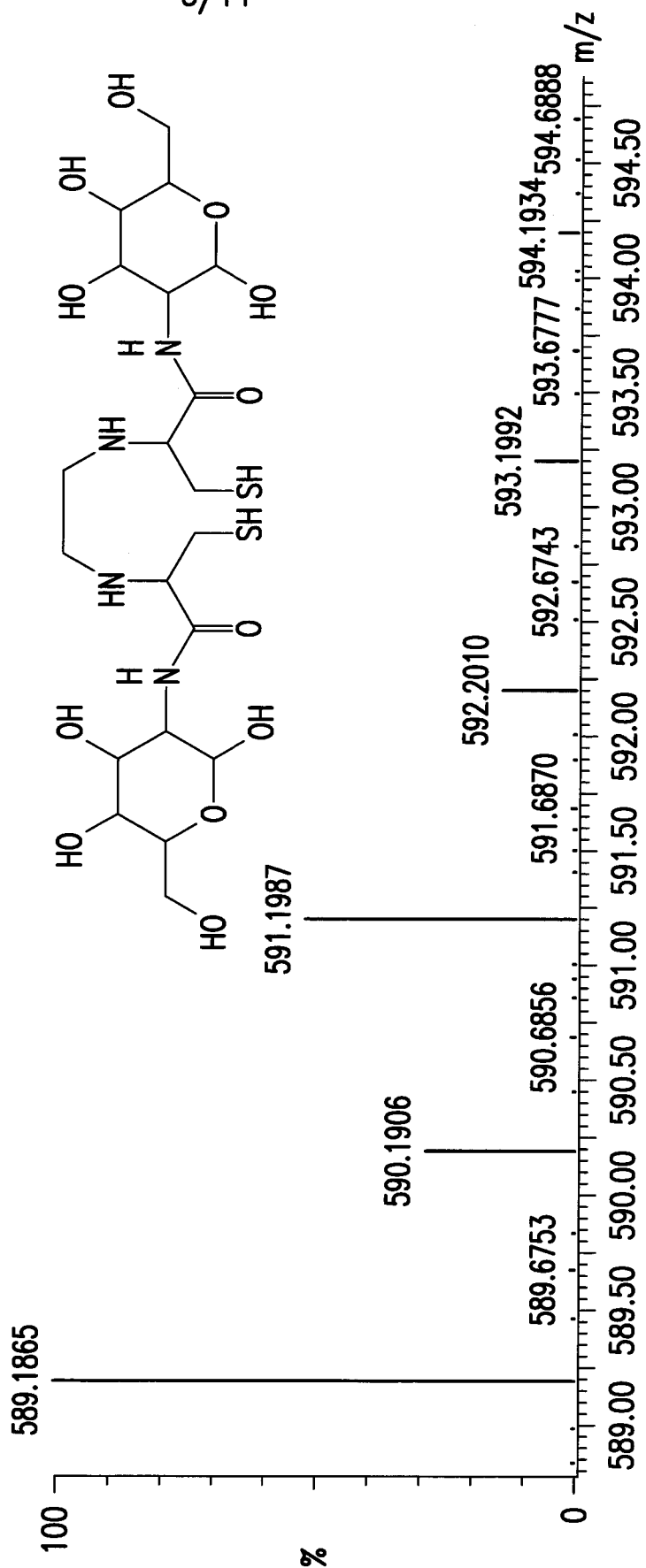


FIG. 5

6/14

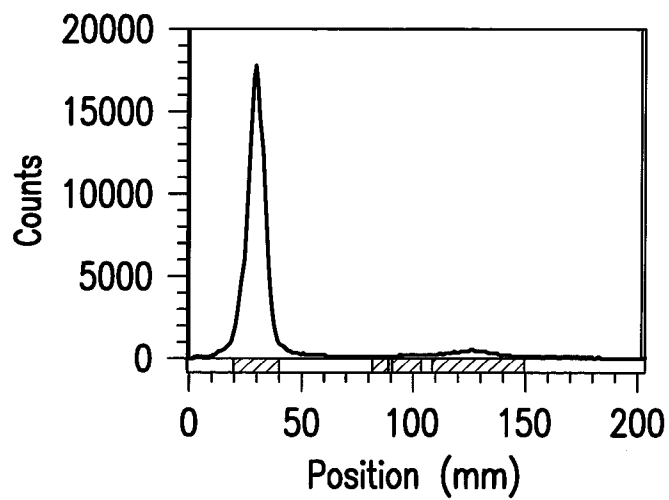


FIG. 6A

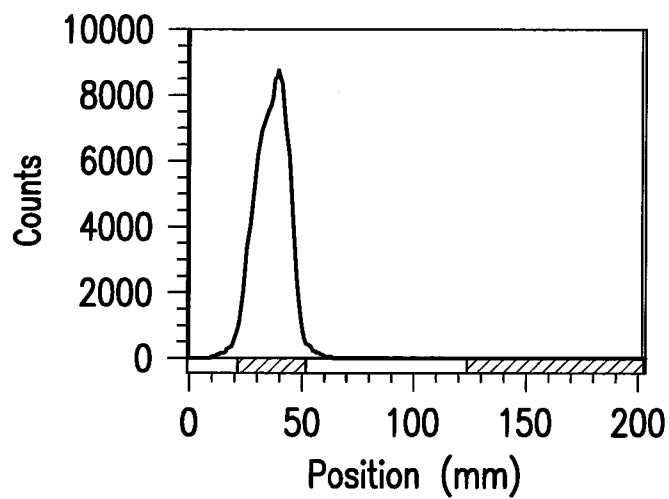


FIG. 6B

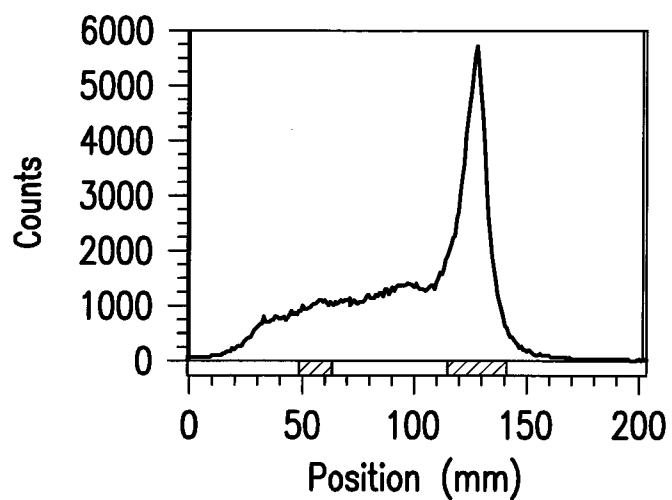


FIG. 6C

7/14

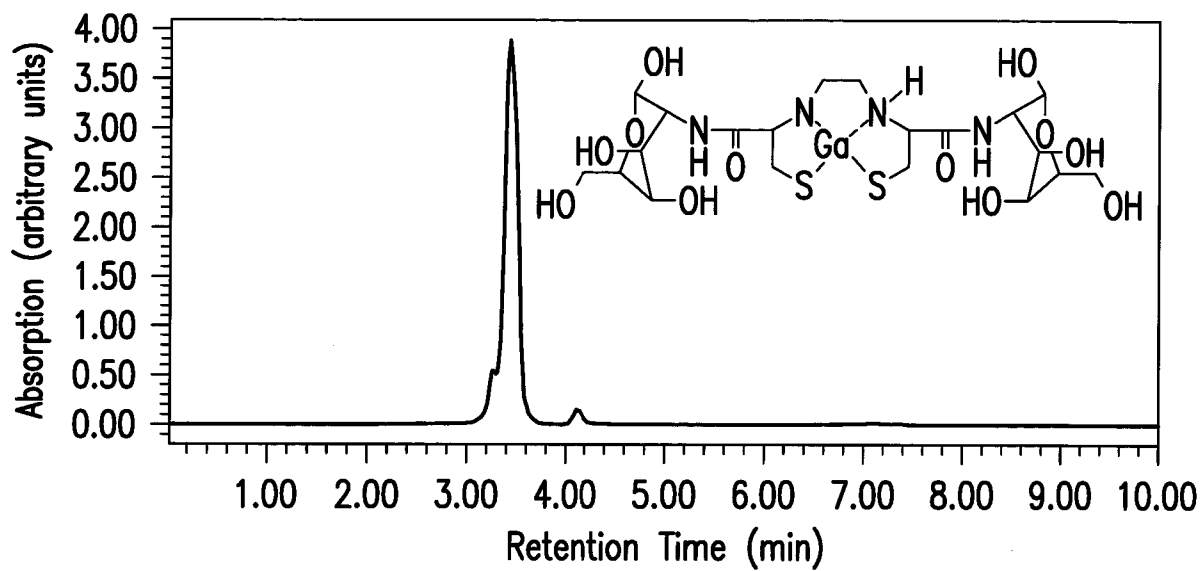


FIG.7A

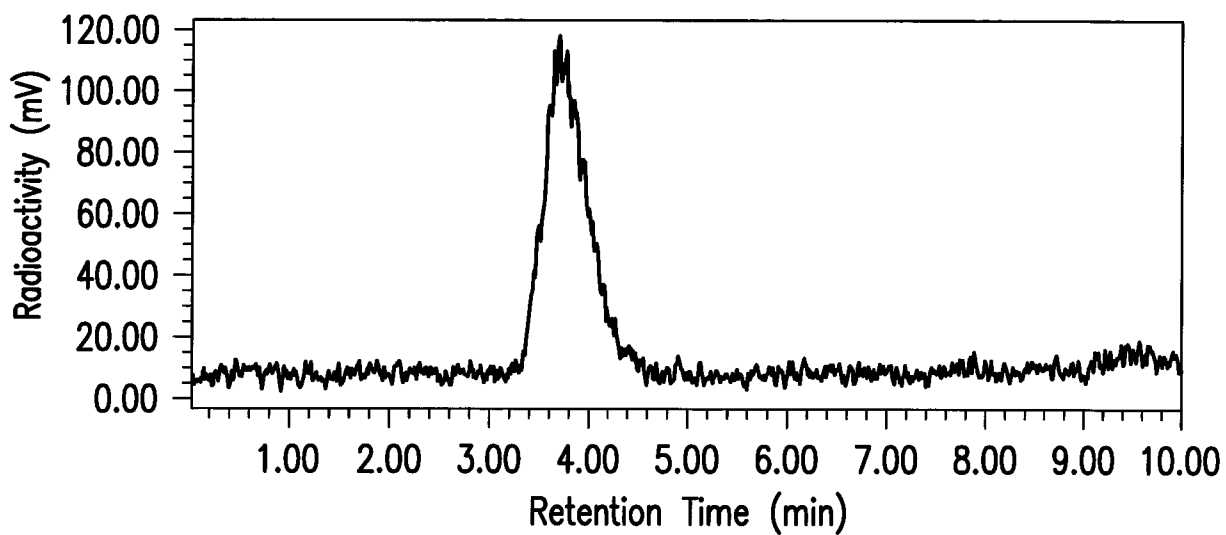


FIG.7B

8/14

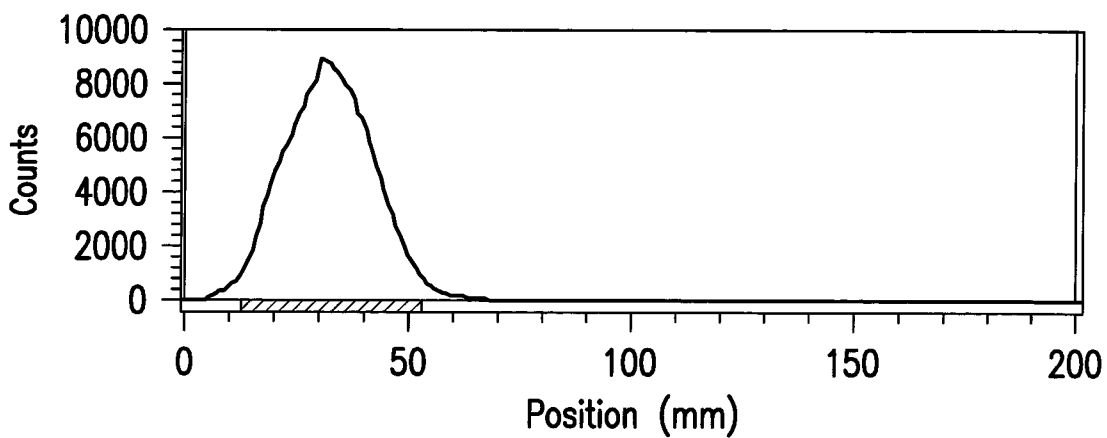


FIG. 8A-(a)

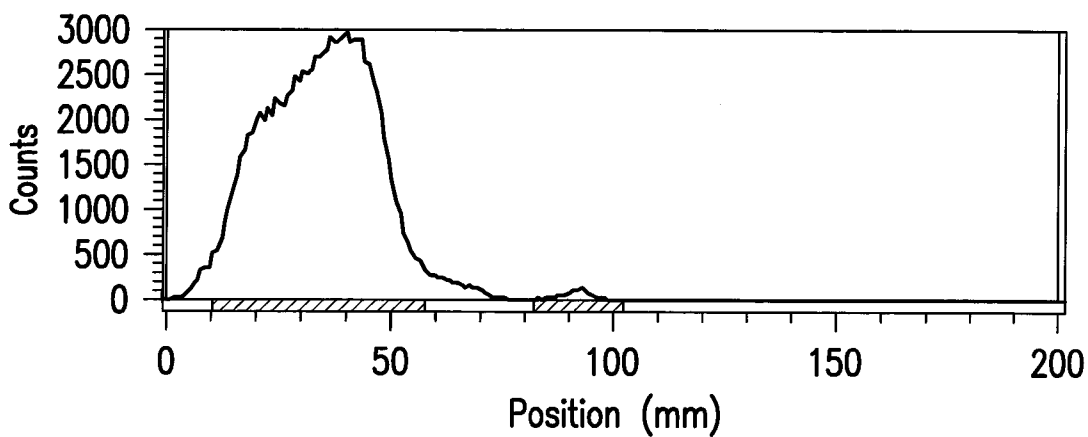


FIG. 8A-(b)

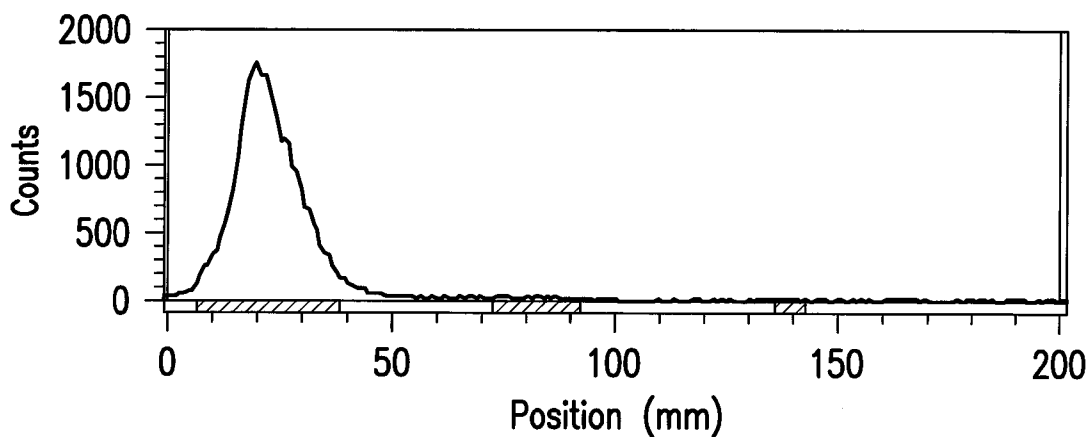


FIG. 8A-(c)

9/14

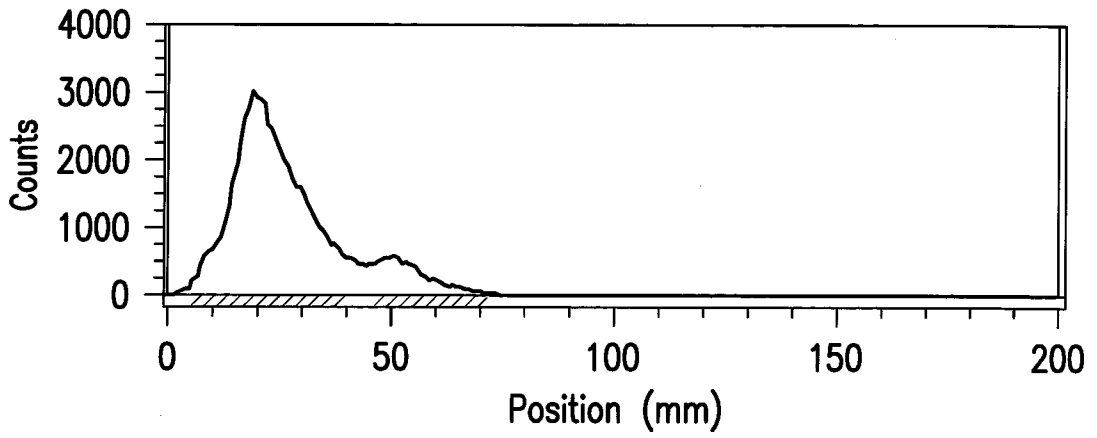


FIG.8B-(a)

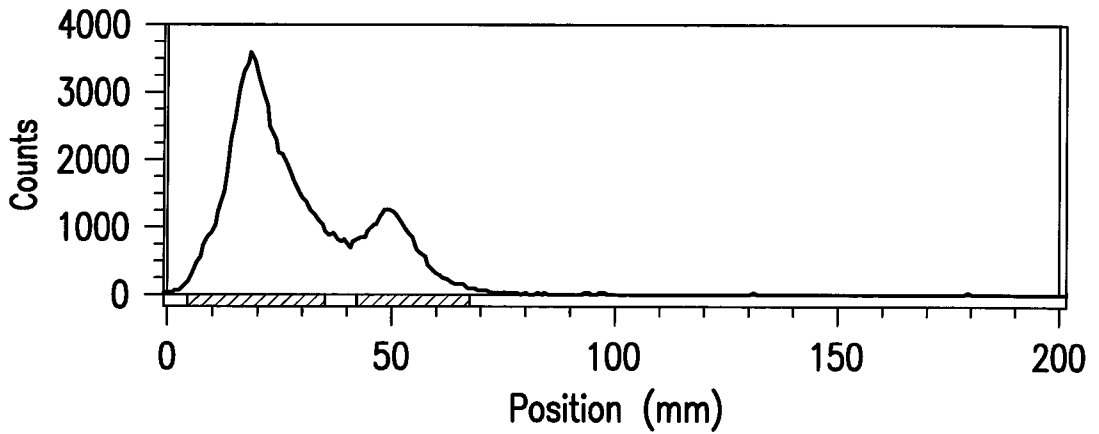


FIG.8B-(b)

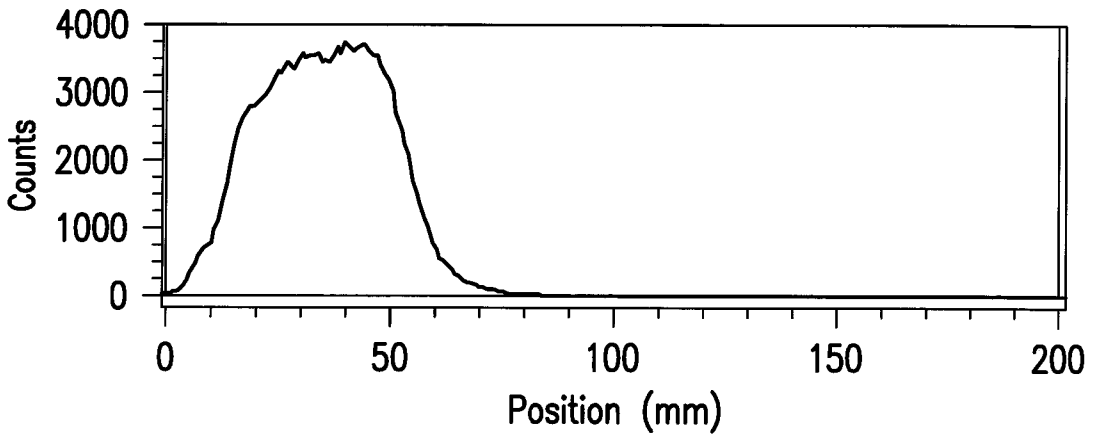
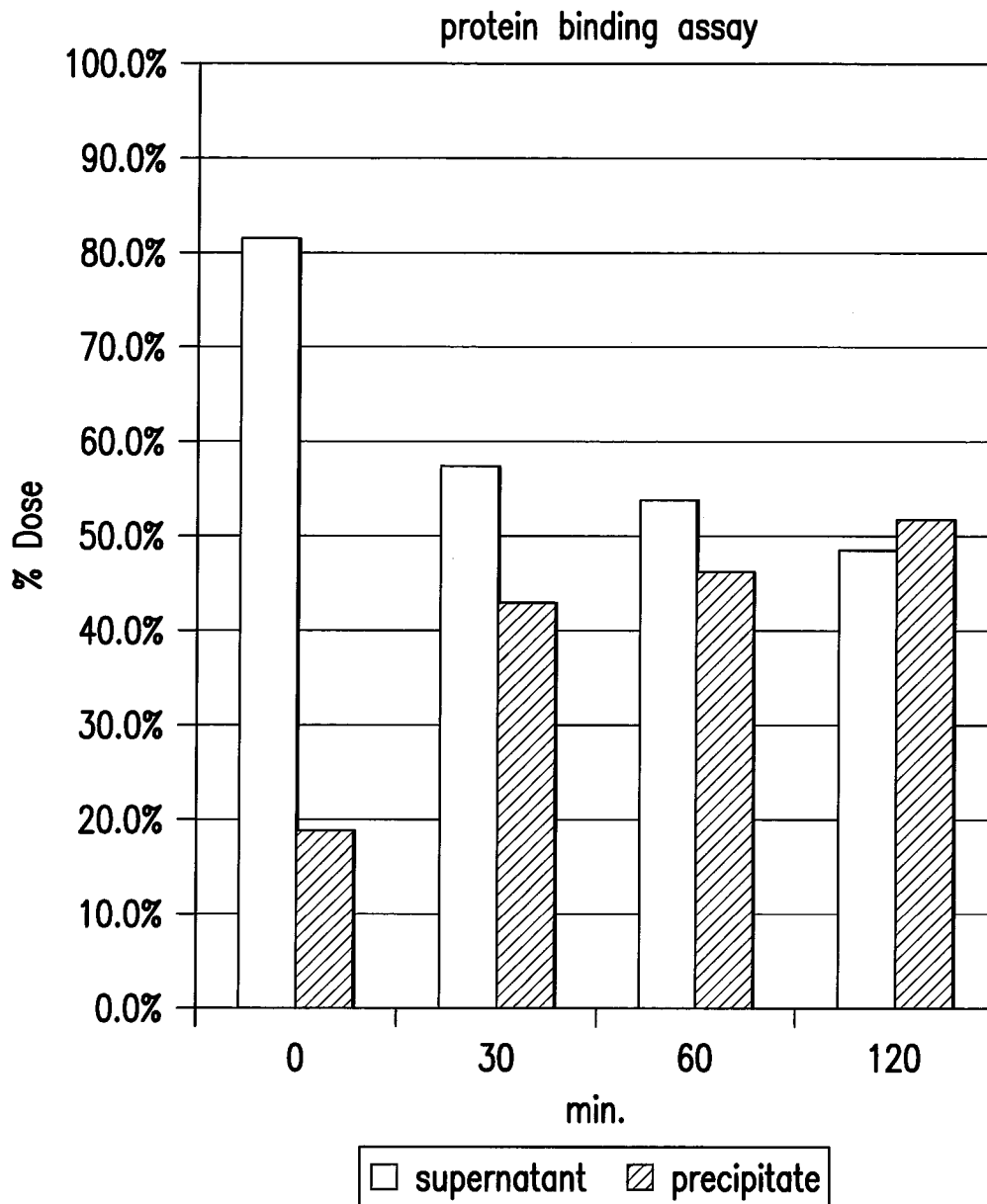


FIG.8B-(c)

10/14



	INCUBATION TIME (MIN.)								GA-EC-BSA	
	0		30		60		120			
SUPERNATANT	92.4	81.4%	50	57.5%	40	53.8%	23.2	48.4%	77.6	93.5%
PRECIPITATE	21.1	18.6%	37	42.5%	34.3	46.2%	24.7	51.6%	5.4	6.5%

FIG.9

11/14

In-Vitro Uptake Study of ⁶⁸Ga-labeled Compounds in Breast Cancer Cell Line 13762

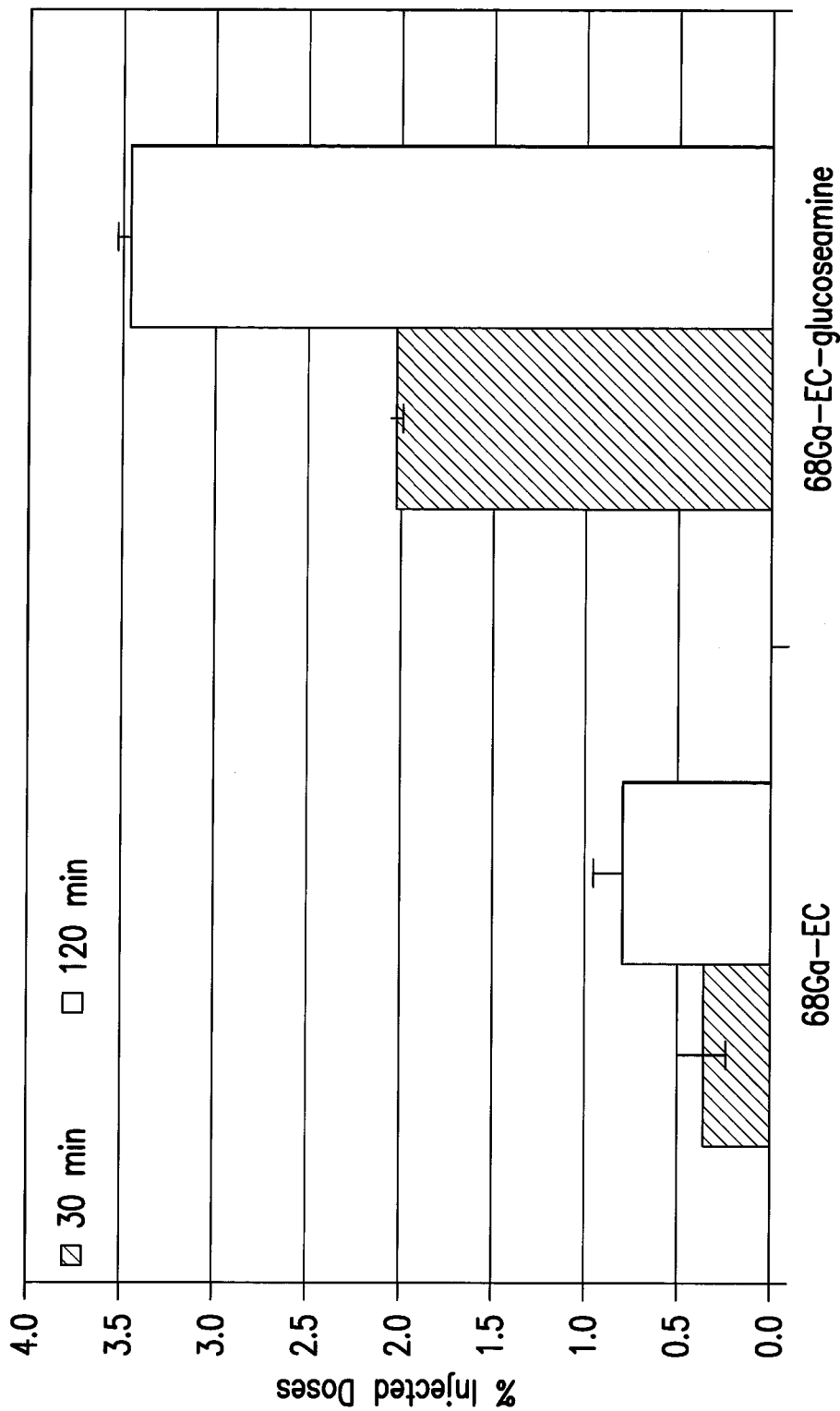


FIG.10

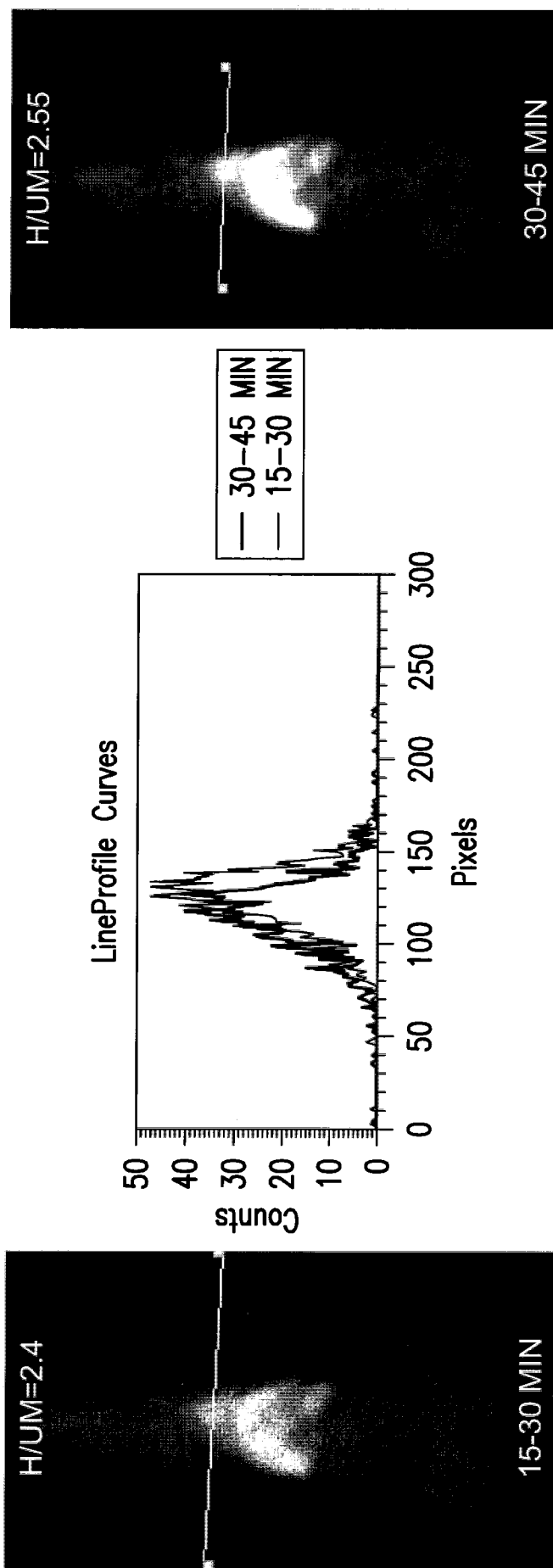


FIG.11

13/14

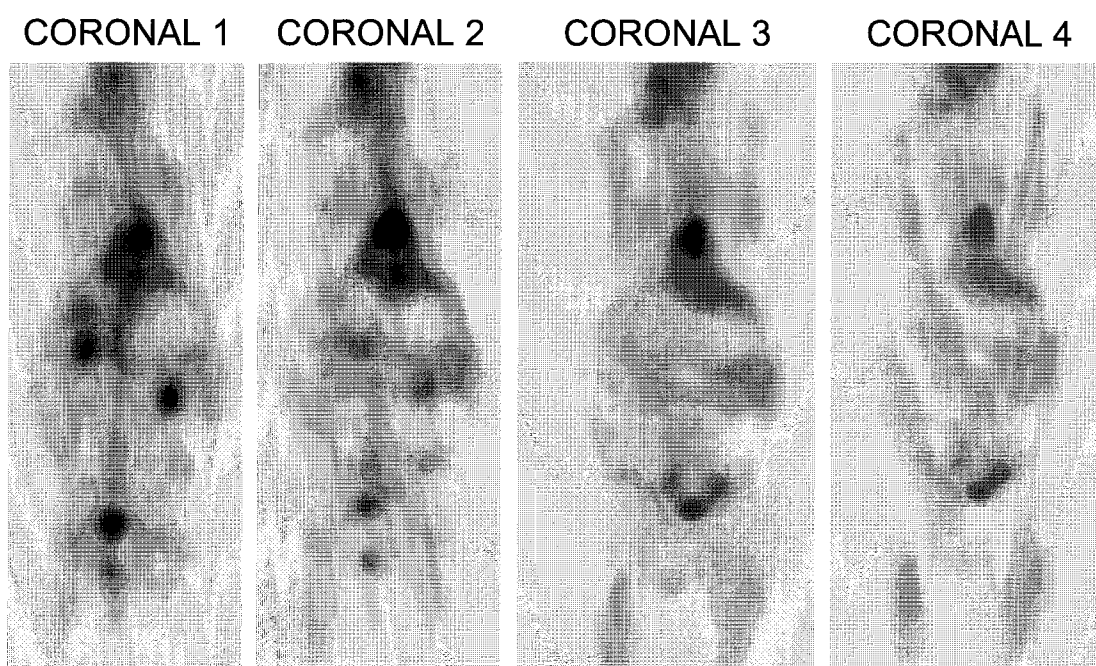


FIG.12

14/14

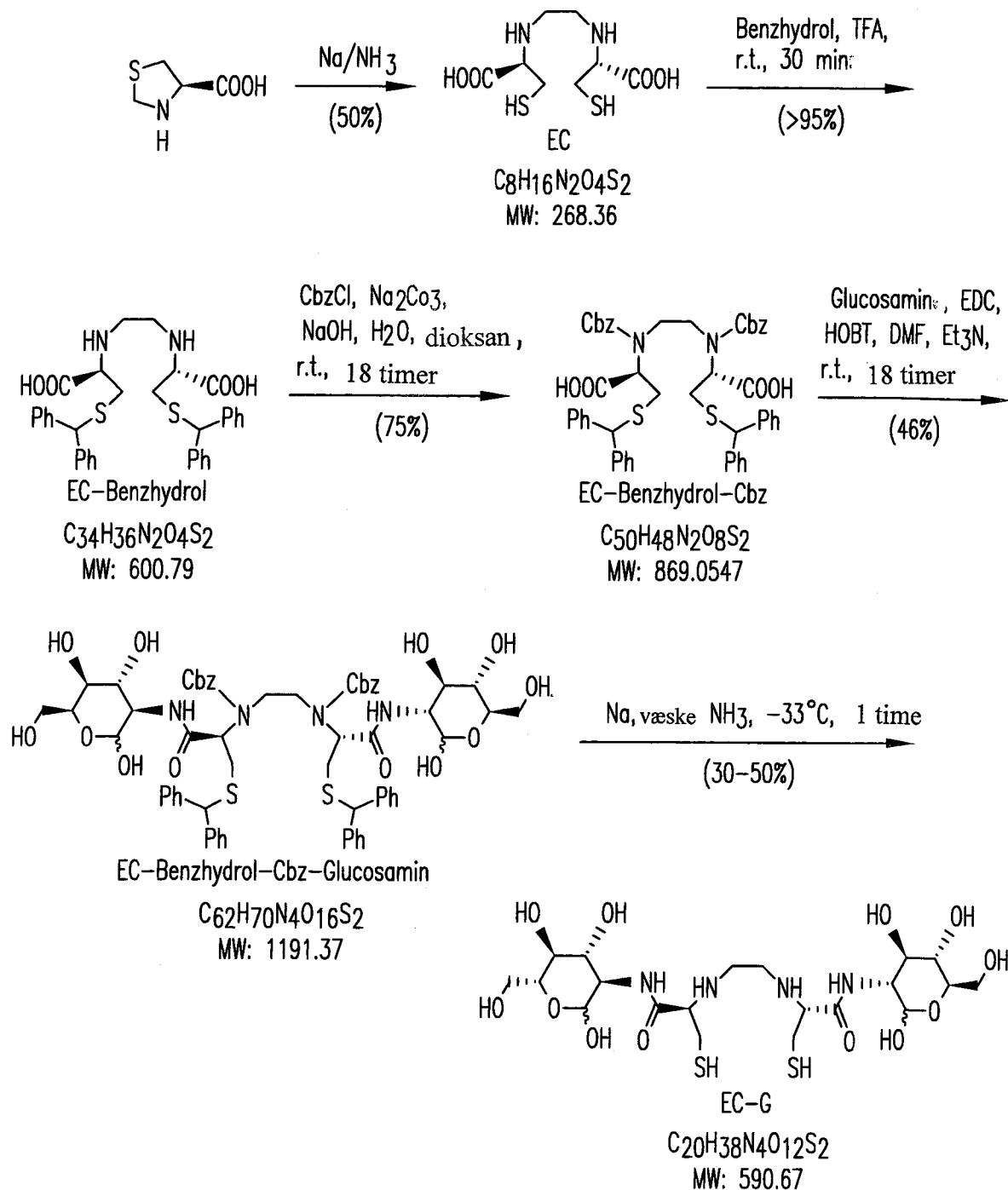


FIG. 13