

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.⁶
C07C 233/54
C07C 229/42
C07C 255/25
C07C 331/28
C07C 233/43
C07F 5/00

(45) 공고일자 1998년12월01일
(11) 등록번호 특0153468
(24) 등록일자 1998년07월04일

(21) 출원번호	특1989-015647	(65) 공개번호	특1990-006273
(22) 출원일자	1989년10월30일	(43) 공개일자	1990년05월07일
(30) 우선권주장	265, 158 1988년10월31일 미국(US)		
(73) 특허권자	더 다우 케미칼 캄파니	리차드 지 워터맨	
(72) 발명자	미합중국 미시간 48640 미들랜드 애보트 로드 다우센터 2030 데이비드 에이 월슨 미합중국 텍사스 77531 리취우드 산 사바 229 조세프 알 갈리취 미합중국 텍사스 77566 레이크 잭슨 서던 오크스 드라이브 301 리차드 케이 프랑크 미합중국 텍사스 77566 레이크 잭슨 사이카모어 722 케네쓰 맥밀란 미합중국 텍사스 77531 리취우드 모어 스트리트 405 제이미 시몬 미합중국 텍사스 77515 앵글톤 라이트 1박스 120-지		
(74) 대리인	김창세, 김영, 장성구		

심사관 : 송재욱

(54) 오르토 결합 작용기를 갖는 킬란트 및 그의 착물

요약

내용 없음.

명세서

[발명의 명칭]

오르토 결합 작용기를 갖는 킬란트 및 그의 착물

[발명의 상세한 설명]

본 발명은 오르토 결합 작용기를 갖는 킬란트, 그의 착물 및 결합물, 그의 제조방법, 그의 사용 제형, 및 암 진단 및/또는 치료에서의 그의 사용 방법에 관한 것이다.

작용화된 킬란트 또는 이작용성 배위자는, 암 또는 종양세포 에피토프(epitope) 또는 항원에 대한 특이성을 갖는 항체에 공유결합될 수 있는 것으로 알려져 있다. 상기 항체/킬란트 결합물의 방사성핵종 착물은 방사성 핵종을 암 또는 종양 세포에 전달함으로써 진단 및/또는 치료용으로 유용하다. 예를 들면, 미어즈(Meares) 등의 논문[Anal. Biochem. 142, 68-78, (1984)] 및 크레즈카렉(Krejcarek) 등의 논문[Biochem. and Biophys. Res. Comm. 77, 581-585 (1977)]을 참조하시오.

아미노카복실산 킬레이트제는 수년동안 문헌에 알려져 연구되어 왔다. 전형적인 아미노카복실산은 니트랄로트리아세트산(NTA), 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA), 하이드록시에틸에틸렌디아민트리아세트산(HEDTA), 디에틸렌트리아민펜타아세트산(DTPA) 및 트랜스-1,2-디아미노사이클로헥산테트라아세트산(CDTA) 이다. 많은 아미노카복실산 계의 이작용성 킬레이트제가 제안되고 제조되어 왔다. 예를 들면, DTPA의 환형 이무수물(참조예: 흐네이토비치(Hnatowich) 등의 논문[Science, 220, 613-615, 1983]; 미합중국 특허 제4,479,930호) 및 DTPA의 혼합된 카복시카복산 무수물(참조예: 간소우(Gansow)의 미합중국 특허 제4,454,106호 및 제4,472,509호; 크레즈 카렉(Krejcarek) 등의 논문[Biochem. and Biophys. Res. Comm. 77, 581-585, 1977])이 문헌에 보고되어 있다. 무수물을 단백질에 커플링시키는 경우, 커플링은 아미드 결합의 형성을 통해 진행되며, 따라서 원래 5개의 카복시메틸 그룹 중 4개가 디에틸렌트리아민(DETA) 주쇄상에 남는다(참조예: 흐네이토비치 등의 논문[Int. J. Appl. Isot. 33, 327-332, 1982]). 또한, 미합중국 특허 제4,432,907호 및 4,352,751호 에는 유기 표적(target) 분자 또는 항체와 같은 유기 성분에 금속이온을 결합시키는데 유용한 이작용성 킬레이트제

가 기술되어 있다. 상기에서와 같이, 디아미노테트라아세트산 이무수물을 사용하여 아마이드 그룹을 통해 커플링시킨다. 무수물의 예로는 EDTA, CDTA, 프로필렌디아민테트라아세트산 및 페닐렌 1,2-디아민테트라아세트산의 이무수물이 포함된다. 최근의 미합중국 특허 제4,647,447호에는 여러 진단 기법에 사용하기 위한, 착물화산의 음이온으로부터 형성된 여러 착물 염이 기술되어 있다. 착물화산의 카복실 그룹을 통한 결합은 아마이드 결합을 통해 결합된다고 개시되어 있다.

아미노카복실산 작용기계 이작용성 킬레이트 제의 또다른 군도 또한 문헌에 잘 언급되어 있다. 선드버그(Sundberg) 등의 논문[J. of Med. Chem. 17 (12), 1304 (1974)]에는 이작용성 EDTA 유사화합물이 기술되어 있다. 대표적인 이돌화합물에는 1-(p-니트로페닐)에틸렌디아민테트라아세트산, 1-(p-아미노페닐)에틸렌디아민테트라아세트산, 및 1-(p-벤젠디아조늄)에틸렌디아민테트라아세트산이다. 파라-치환제를 통한 단백질에의 커플링, 및 방사성 금속이온의 킬레이트 그룹에의 결합이 기술되어 있다. 그 화합물은 또한 문헌[Biochem. Biophys. Res. Comm. 75 (1), 149 (1977)] 및 미합중국 특허 제3,994,966호 및 제4,043,998호에도 기술되어 있다. 에틸렌디아민 주쇄의 탄소를 통해 EDTA 구조에 방향족 그룹이 결합된다는 것을 아는 것이 중요하다. 미합중국 특허 제4,622,420호에는 EDTA, HEDTA 및 DTPA계 광학활성 이작용성 킬레이트제가 기술되어 있다. 또한, 이 참고 특허에서도, 에틸렌디아민 주쇄의 탄소를 통해 이작용성 킬레이트 분자의 잔기에 아미노카복실산 작용기가 결합된다. 이들 화합물에서, 알킬렌 그룹은 킬레이트 작용기를 함유하는 폴리아민의 탄소에 방향족 그룹(단백질에 결합하는데 필요한 작용기를 함유함)을 결합시킨다. 상기 화합물에 관한 다른 참고 문헌으로 브레취비엘(Brechbiel) 등의 논문[Inorg. Chem. 25, 2772-2781 (1986)], 미합중국 특허 제4,647,447호 및 PCT 출원 공개 공보 WO 제86/06384호가 있다. 더 최근에는, 진단 또는 치료용으로 특정 거대한 환경 이작용성 킬레이트제 및 이들의 구리 킬레이트 결합물을 사용하는 것이 미합중국 특허 제4,678,667호에 기술되어 있다. 환형 폴리아민 주쇄의 탄소 고리를 통해 아미노카복실산 작용기가 이작용성 킬레이트 분자의 잔기에 결합된다. 따라서, 환형 폴리아민의 탄소 고리의 한쪽 말단에 결합된 결합기(linker)는, 단백질과 반응할 수 있는 작용성 그룹의 다른쪽 말단에도 또한 결합된다.

이작용성 킬레이트제의 또다른 군은, 분자의 킬레이트화 잔기 즉, 아미노카복실산이 질소를 통해, 단백질과 반응할 수 있는 잔기를 함유하는 분자의 작용성 그룹에 결합되는 화합물로 이루어진다는 것도 또한 알아둘만하다. 예를 들면, 미콜라(Mikola) 등의 PCT 출원 공개 공보 WO 제84/03698호(1984. 9. 27 공개됨)에는 p-니트로벤질 브로마이드를 DETA와 반응시킨 다음 브로모아세트산과 반응시켜 아미노카복실산을 제조함으로써 제조된, 이작용성 킬레이트제가 기술되어 있다. 니트로 그룹은 상응 아민 그룹으로 환원된 다음, 티오포스겐과 반응하여 이소티오 시아네이트 그룹으로 전환된다. 이 화합물은 란타늄 화합물을 킬레이트화할 수 있는 진단제로 사용하기 위해 생-유기 분자에 결합될 수 있는 이작용성 킬레이트제이다. 아미노-카복실산의 질소중 하나를 통해 결합기 부분이 결합되기 때문에, 킬레이트화하는 동안 하나의 잠정적 아미노카복실 그룹이 손실된다. 따라서, 4개(5개가 아님)의 산 그룹을 함유하는 DETA-계 이작용성 킬란트가 제조된다. 이점에 있어서, 이작용성 킬란트의 이 군은, 카복실 킬레이트화 그룹을 계속 손실하면서 아마이드 그룹을 통해 단백질에 결합되는 군과 유사하다.

파이크(Paik) 등의 논문[J. Radioanalytical chem. 57 (12), 553-564 (1980)]에는 p-니트로벤질브로마이드를 블럭화된 (blocked) 디에틸렌트리아민, 즉, 비스-(2-프탈이미도에틸)아민과 반응시킨 다음, 탈블럭화 공정 및 클로로아세트산을 사용한 카복시메틸화에 의해, N'-p-니트로벤질디에틸렌트리아민 N,N',N,N'-테트라아세트산을 얻는 것이 기술되어 있다. 역시 질소를 통해 결합되기 때문에, 테트라아세트산 유도체가 얻어진다. 이작용성 킬레이트제의 결합 및 인동과의 킬레이트화가 언급되어 있다. 또한, 엑켈만(Eckelman) 등의 논문[J. Pharm. Sci. 64 (4), 1975]에는 에틸렌디아민 또는 디에틸렌트리아민과 같은 아민을 적합한 알킬 브롬화물과 반응시킨 후 카복시메틸화함으로써 질소 원자 상에서 치환시키는 것이 개시되어 있다. 상기 화합물은 가능한 방사 약제학적 영상제(imaging agents)로 제시되어 있다.

최근에는, 카니(Carney), 로저스(Rogers), 및 존슨(Johnson)이 인동-111로 표지된 항체의 고유하게 높은 조직 흡수성의 부재; nude 마우스(nude mouse) 모델에서의 인동-111 및 요오드-125 로 표지된 B72.3 의 동시투여 및 인동-111로 표지된 B72.3 면역성 결합물의 nude 마우스에서의 생체분포에 미치는 킬레이트자 덴티시티(denticity)의 영향이라는 명칭의 초록을 기술하였다(모노클론성 항체에 대한 제3차 국제회의: 산디에고, 캘리포니아 - 1988년 2월 4~6일). EDTA 및 DTPA 이작용성 킬레이트제와 착물은 이 군 인동-111의 생체분포가 기술되어 있다. 아세테이트 라디칼을 통해 EDTA/DTPA 잔기에 방향족 고리가 결합된다. 헌트(Hunt) 등의 미합중국 특허 제4,088,747호 및 제4,091,088호(1978)에는, 알킬렌 또는 아세테이트 라디칼을 통해 방향족 고리가 EDDA 잔기에 결합되는 에틸렌디아민디아세트산(EDDA)계 킬레이트제가 기술되어 있다. 이들 화합물은 간담즙의 작용 연구용 킬레이트로서 유용하다고 개시되어 있다. 바람직한 금속은 테크네튬-99m 이다. 인동-111 및 인동-113도 또한 영상화에 유용한 방사성핵종으로 개시되어 있다.

마르텔(Martell) 등의 논문[Inorganica Chimica Acta 138, 215-230 (1987)]에는 쿨리(Cooley)형의 빈혈증을 치료하기 위한 철 킬레이트제가 기술되어 있다. 사용된 리간드는 아미노 및 카복실레이트 공여체 그룹을 갖거나, 유사 페놀성 그룹 또는 피리딘 고리상에서 치환된 페놀성 그룹이 있는 추가의 공여체 그룹을 갖는 EDTA의 유사화합물; 추가의 페놀레이트 및 아미노 공여체를 가진 아미노포스폰산 또는 에스테르 그룹; 카복실레이트 및/또는 페놀레이트 공여체 그룹을 가진 거대한 환형 폴리아민; 트리스하이드로 옥삼산; 트리스카테콜; 및 배위성 아마이드 그룹을 가진 다중덴테이트 리간드였다.

골전이 현상은 암 환자의 통상적이고, 주로 파괴적인 현상이다. 이들 전이성 병변에 의해 야기되는 통증, 병리학적 특징, 빈번한 신경박약 및 강제적 고정성은 암 환자의 생활의 질을 상당히 낮춘다. 유발, 폐 또는 전립선 암에 걸린 모든 환자의 약 50%가 결국 골 전이 현상을 나타내기 때문에 골전이성 질병에 걸린 환자의 수가 많다. 골전이는 또한 신장, 갑상선, 방광, 경관 및 기타 종양암을 가진 환자에게서 볼 수 있으며, 통상, 이들은 골 전이 현상을 나타내는 환자의 20% 미만을 나타낸다. 전이성 골암은 생명을 거의 위협하지 않으며, 때때로 환자들은 골병변을 발견한 후 수년을 살기도 한다. 초기에는 치료목표가 통증을 없애고, 마취약물치료에 대한 필요성을 줄이고, 이동성을 증가시키는데 있다. 명확하게는 다소의

암을 치료할 수 있기를 바란다.

골로 전이하는 암의 치료에 방사성핵종을 사용하는 것은 1950년대 초기로 거슬러 올라간다. 석회화 병변의 치료를 위해 적합한 형태의 방사성 입자 발산 핵종을 주사하는 것이 제안되어 왔다. 상기 핵종은, 연조직 및 정상적인 골에 최소량 도달하면서 골 병변의 영역에 집중되는 것이 바람직하다. 방사성 인 (P-32 및 P-33) 화합물이 제안되었으나, 핵 및 생체국부화 성질이 이들 화합물의 유용성을 제한한다(카플란(Kaplan E.) 등의 논문[J. Nuc. Med. 1 (1), (1960)]; 및 미합중국 특허 제3,965,254호 참조).

붕소 잔기를 함유하는 인 화합물을 사용하는, 골암 치료에 대한 또다른 시도가 행해졌다. 이들 화합물을 신체에 주사하여(정맥내 주사). 골격계에 축적시켰다. 다음에, 붕소를 활성화하고 치료용 방사용량을 얻기 위해 치료 부위에 중성자를 조사하였다(미합중국 특허 제4,399,817호).

상기 언급된 공정에서, 정상적인 조직에 대한 실질적인 손상 없이 종양에 대해 치료 용량을 얻는 것은 불가능하다. 대부분의 경우, 특히 전이성 골 병변의 경우, 종양은 골격계 전체에 퍼져 있으며, 수술 및 조사가 실용적이지 못하다([Seminars in Nuclear Medicine IX (2), 4월, 1979] 참조).

또한, 디포스포네이트와 착물을 이룬 Re-186을 사용하는 것이 제안되었다(메티유(Mathieu, L.) 등의 논문[Int. J. App. Rad. Isot. 30, 725-727 (1979)]; 웨이넨저(Weinenger, J.), 케트링(Ketring, A.R.) 등의 논문[J. Nuc. Med. 24 (5), 125, (1983)] 참조). 그렇지만, 이 착물의 제조방법 및 이에 필요한 정제는 이의 유용성 및 넓은 용도를 제한한다.

또한, 전이성 골 병변을 가진 환자를 위한 스트론튬-89가 제안되었다. 그러나, 긴 반감기(50.4일), 혈액 중의 높은 함량 및 정상적인 골에 대한 낮은 병변율이 불리할 수 있다(파이루시안(Firusian, N.), 멜린(Mellin, P.), 슈미트(Schmidt, G.G.)의 논문[The Journal of Urology, 116, 764, (1976)]; 슈미트, 파이루시안의 논문[Int. J. Clin. Pharmacol., 93, 199-205, (1974)] 참조).

골 전이의 말기 치료로 I-131로 표지된 α -아미노-(3-요오드-4-하이드록시벤질리덴)디포스포네이트를 사용하는 것이 보고되어 있다(아이젠허트(Eisenhut, M.)의 논문[J. Nuc. Med. 25 (12), 1356-1361, (1984)]참조). 치료용 방사성핵종으로서 방사성 요오드를 사용하는 것은 감상선에 국한되는 요오드의 잘 알려진 경향으로 인해 그다지 바람직하지 않다. 상기 아이젠허트의 논문에는, 이 화합물의 가능한 대사 산물 중 하나로서 요오드화물이 기술되어 있다. 또한, 요오드화 반응으로부터 생성되어 세척공정에서 분리되지 않은 어떠한 I-131 은 감상선에 해롭다.

아미노카복실산은 킬레이트 금속 이온을 킬레이트화하는 것으로 알려져 있다. 특히 안정한 킬레이트는 알카리토 금속 및 전이 금속 군중의 금속과 형성된다.

오'메이라(O'Mara)등의 논문[J. Nuc. Med. 10, 49-51, 1969]에는 10:1의 킬란트 대 금속 비로 아미노카복실산의 희토류 착물을 제조하는 것이 기술되어 있다. 이들은 상기 화합물의 골에 대한 우수한 특성을 발견하고, 골 진단제로서의 사용을 제안하였다. 골의 높은 흡수 이외에도, 근육 및/또는 간에서 많은 양의 방사성 물질이 관측되었다. 측정된 희토류 핵종중에서, Sm-153 및 Er-171이 인간에게 있어서 영상화에 대해 최상의 적합한 특성을 갖는 것으로 나타났다. 그러나 이들 약품의 치료에 대한 유용성은 제시되어 있지 않다.

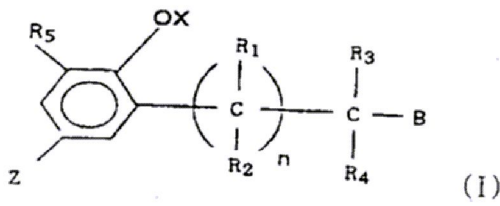
로스프(Rosoff, B.)등의 논문[Int. J. App. Rad. and Isot. 14, 129-135 (1963)]에는 EDTA 및 NTA와 특정 방사성 핵종, 즉, Sc-46, Y-91, La-140 및 Sm-153 과의 착물이 기술되어 있다. 뇨 배출에 대한 이들 착물의 안정성 상수의 관계가 나타나 있다. 5:1의 킬란트 대 금속 물비를 사용하였으며, 높은 농도의 방사성 물질이 간, 비장, 신장, 폐 및 골에서 관측되었다.

본 발명은 금속 특히, 희토류 화학작용을 하는 방사성 금속과 착물을 형성하는, 오르토 결합 작용기를 갖는 신규의 킬란트에 관한 것이다. 바람직한 방사성 금속에는 사마륨-153(¹⁵³Sm), 홀뮴-166(¹⁶⁶Ho), 이트륨-90(⁹⁰Y), 프로메티움-149(¹⁴⁹Pm), 가돌리늄-159(¹⁵⁹Gd), 란타늄-140(¹⁴⁰La), 루테튬-177(¹⁷⁷Lu), 이터븀-175(¹⁷⁵Yb), 스칸듐-47(⁴⁷Sc) 및 프라세오다이뮴-142(¹⁴²Pr)이 포함된다. 그렇게 형성된 착물은 그 자체로 사용되거나, 항체 또는 그의 단편에 부착되어 치료 및/또는 진단 목적으로 사용될 수 있다. 착물 및/또는 결합물은 생체용 또는 시험관 용으로 제형될 수 있다. 제형된 결합물의 바람직한 용도는 동물, 특히 인간의 암 치료이다.

또한, 특정의 킬란트-방사성핵종 착물은 석회화 종양의 치료제 및/또는 진단제로 유용한 조성물, 및/또는 골의 통증을 치료하기 위한 치료제로 유용한 조성물에 효과적으로 사용할 수 있다.

더욱 구체적으로, 본 발명은 하기 일반식(1)을 갖는 화합물 또는 그이 약제학적으로 허용가능한 염에 관한 것이다.

화학식 1



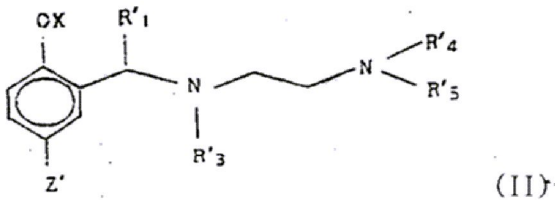
상기식에서,

Z는 항체 또는 그의 단편에 공유결합될 수 있는 친전자성 또는 친핵성 잔기, 또는 방사성핵종과의 착물 형성을 방해하지 않고 항체 또는 그의 단편에 결합될 수 있는 합성 결합기이고; X는 수소, C₁ 내지 C₃ 알킬 또는 CR₃R₄COOH 이며; R₁, R₂, R₃ 및 R₄는 각각 독립적으로 수소, 하이드록시, CO₂H 또는 C₁ 내지 C₃ 알킬 그룹이고; R₅는 수소 또는 (CR₁R₂)_nCR₃R₄B 이며; B는 아민 수소의 최소한 하나가 CR₃R₄COOH 그룹으로 치환된 선형 또는 분지형 아민, 또는 폴리알킬렌 아민을 나타내고; n은 0 또는 1이다.

카복실 그룹이 존재하여 B 그룹의 질소로부터 제1 또는 제2의 탄소, 즉, 킬란트 잔기에서의 질소에 대하여 α 또는 β 탄소에 결합되는 것이 바람직하다. 일반식(I)의 바람직한 화합물은, n이 0이고; 또는 R₁, R₂, R₃ 및 R₄가 각각 수소이고; 또는 n이 0이고 R₃ 또는 R₄중 하나는 수소이며 나머지는 COOH이고; 또는 X가 수소인 화합물이다. 킬란트를 이작용성 킬레이트제로 사용하는 경우, Z는 아미노, 이소티오시아네이트, 세미카바자이드, 티오세미카바자이드, 카복실, 브로모아세트아미도 또는 말레이미도가 바람직하다.

또한, 본 발명은 하기 일반식(II)를 갖는 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염에 관한 것이다.

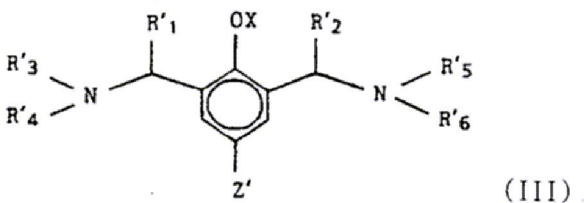
화학식 2



상기식에서, Z'는 수소, NH₂, NO₂, NHC(O)CH₃ 또는 N(R')₂ (여기에서, R'는 수소 또는 C₁ 내지 C₃ 알킬이다) 이고; X는 수소, C₁ 내지 C₃ 알킬 또는 CR₃R₄COOH이며; R'₁는 수소 또는 COOH이고; R'₃, R'₄ 및 R'₅는 독립적으로 수소 또는 CR₃R₄COOH이다(단, R'₁, R'₃, R'₄ 및 R'₅ 중 최소한 하나는 수소이다).

또한, 본 발명은 하기 일반식(III)을 갖는 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염에 관한 것이다.

화학식 3



상기식에서, Z'는 수소, NH₂, NO₂, NHC(O)CH₃ 또는 N(R')₂ (여기에서, R'는 수소 또는 C₁ 내지 C₃ 알킬이다) 이고; X는 수소, C₁ 내지 C₃ 알킬 또는 CR₃R₄COOH이며; R'₁는 수소 또는 COOH이고(단, 최소한 하나는 COOH이다); R'₃, R'₄ 및 R'₅는 독립적으로 수소 또는 CR₃R₄COOH이다(단, 최소한 세개가 CR₃R₄COOH이다).

본 발명은 또한, 방사성 금속 이온 착물, 특히 방사성 희토류 금속 이온 착물, 및 상기 착물과 항체 또는 항체 단편으로 형성된 결합물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 또한 킬란트-방사성핵종 착물 및/또는 본 발명의 결합물, 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 갖는 제제를 포함한다. 전형적으로, 이들 제제내의 약제학적으로 허용가능한 담체는 액체 형태이다. 본 발명은 또한 효과량의 제제를 포유동물에게 투여함으로써, 포유동물의 질병상태, 특히 암을 진단 또는 치료하는 법을 포함한다.

본 명세서에서, 하기 지적인 용어는 하기 의미를 갖는다.

Z의 정의에 있어서, 친전자성 잔기에는 이소티오시아네이트, 브로모아세트아미드, 말레이미드, 이미도 에스테르, 티오프탈리미드, N-하이드록시석신이밀 에스테르, 피리딜 디설파이드 및 페닐 아지드가 포함되며, 이에 국한되지는 않고; 적합한 친핵성 잔기에는 카복실, 아미노, 아실 히드라지드, 세미카바자이드, 및 티오세미카바자이드가 포함되며, 이에 국한되지는 않고; 합성 결합기에는 항체 또는 항체 단편에 공유결합될 수 있는 합성 유기 또는 무기 결합기가 포함되고, 바람직한 합성 결합기는 환자의 혈청에서 안정하지만, 방사성 동위원소의 제거 기관내에서 효소 분해를 일으킬 수 있는 생분해성 합성 결합기 예를 들면, 생분해성 펩타이드 또는 펩타이드 함유 그룹이다.

친전자성 잔기중에서는, 이소티오시아네이트, 브로모아세트아미드 및 말레이미드가 바람직하고, 이소티오시아네이트가 특히 바람직하며; 친핵성 잔기중에서는 아미노, 카복실, 세미카바자이드 및 티오세미카바자이드가 바람직하고, 아미노 및 카복실이 특히 바람직하다. Z의 특성 및/또는 위치는 킬레이트화 반응을 거의 방해하지 않도록 하는 것이 바람직하다. Z는 또한, 목적용도가 킬레이트의 단백질에의 결합을 포함하지 않는 경우, H, NO₂, NHC(O)CH₃, NR'₂(여기에서, R'는 수소 또는 C₁ 내지 C₃ 알킬이다)와 같은 비-반응성 잔기일 수도 있다.

C₁ 내지 C₃ 알킬이란 용어는 메틸, 에틸, n-프로필 및 이소프로필을 포함한다.

선형 또는 분지형 아민 또는 폴리알킬렌 아민이란 용어는 최소한 하나의, 보통 하나 이상의 질소 원자를 함유하는 직쇄 또는 측쇄 알킬 잔기를 의미한다.

본 명세서에 사용된 포유동물이란 용어는 그들의 자식에게 유전에 의해 분비된 젖을 주는 동물, 바람직하게는 온혈 포유동물, 보다 바람직하게는 인간을 의미한다.

항체는 폴리클론성, 모노클론성, 키메라 항체, 또는 헤테로항체, 바람직하게는 모노클론성 항체를 가리키며; 항체 단편은 Fab 단편 및 F(ab')₂ 단편을 포함하고, 항체의 모든 부위는 목적하는 에피토프(epitope) 또는 에피토프들에 대해 특이성을 갖는다. 방사성 금속 킬레이트/항체 결합물 또는 결합물이란 용어가 사용되면, 항체는 반합성 또는 유전적으로 처리된 변이체를 비롯한 모든 항체 및/또는 항체 단편을 포함하는 것을 의미한다. 바람직한 항체는 CC-49이고 Fab 및 F(ab')₂와 같은 항체 단편이 바람직하다. 기타 가능한 항체는 CC-83 및 B72.3이다. 하이브리도마(hybridoma) 세포 계통 B72.3은 기탁 번호 ATCC HB 8108를 갖는 아메리칸 타입 컬처 콜렉션(American Type Culture Collection)(ATCC)에 기탁되어 있다. 기타 쥐(murine)의 모노클론성 항체는, 항원과 연관된 종양, TAG-72의 에피토프에 결합된다.

본 명세서에 사용된 방사성 금속 착물 또는 착물은, 희토류 금속이온, 특히 방사성 희토류 금속이온과 착물을 이룬, 예를 들면 일반식(1)과 같은 본 발명의 화합물의 착물(여기에서, 최소한 하나의 금속 원자가 킬레이트화되거나 은폐된다)을 가리키며; 방사성 금속 이온 킬레이트/항체 결합물 또는 방사성 금속 이온 결합물은 항체 또는 항체 단편에 공유 결합된 방사성 금속 이온 결합물을 가리키고; 금속 이온이란 단어와 방사성이 함께 사용되면, ¹⁵³Sm, ¹⁶⁶Ho, ⁹⁰Y, ¹⁴⁹Pm, ¹⁵⁹Gd, ¹⁴⁰La, ¹⁷⁷Lu, ¹⁷⁵Yb, ⁴⁷Sc 및 ¹⁴²Pr 과 같은 입자 및/또는 광자를 방출하는 희토류 원소의 하나 이상의 동위원을 가리킨다. 이작용성 배위자, 이작용성 킬레이트제 및 작용화된 킬란트란 용어는 호환성있게 사용되며, 금속이온을 킬레이트화할 수 있는 킬란트 잔기, 및 항체 또는 항체 단편에 공유 결합하기 위한 수단으로 제공될 수 있는 킬란트 잔기에 공유 결합되는 결합기/공간자(spacer) 잔기를 가리킨다.

본 명세서에 사용된 약제학적으로 허용가능한 염은 포유동물의 치료 또는 진단에 유용할 수 있도록 충분히 비독성인, 일반식(1)의 화합물의 모든 염을 의미한다. 따라서, 그 염들은 본 발명에 따르면 유용하다. 대표적인 상기 염들은, 표준 반응에 의해 예를 들면, 황산, 염산, 인산, 아세트산, 석신산, 시트르산, 락트산, 말레산, 푸마르산, 팔미트산, 콜산, 파오산, 무크산, 글루탐산, d-캄포르산, 글루타르산, 글리콜산, 프탈산, 타르타르산, 포름산, 라우르산, 스테아르산, 살리실산, 메탄설폰산, 벤젠설폰산, 소르브산, 피크르산, 벤조산, 신남산 및 다른 적합한 산을 포함하는 유기 및 무기 공급원으로부터 제조된다. 또한, 암모늄, 알카리 금속 이온, 알카리토 금속 이온, 및 기타 유사이온과 같은 유기 및 무기 공급원으로부터 표준 반응에 의해 제조된 염들도 포함된다. 염이 칼륨, 나트륨, 암모늄, 또는 그의 혼합물인, 일반식(1)의 화합물의 염이 특히 바람직하다.

본 명세서에 기술된(일반식(1)로 나타냄) 이작용성 킬레이트제는 희토류 금속 이온, 특히 방사성 희토류 금속 이온을 킬레이트화 또는 은폐하여 금속 이온 킬레이트(본 명세서에 착물로 나타내기도 함)를 형성하는데 사용할 수 있다. 작용화 잔기(일반식(1)에서 Z로 나타냄)의 존재때문에, 상기 착물은 작용화된 중합체성 지지체와 같은 작용화된 지지체에 결합되거나, 바람직하게는 항체 또는 항체 단편에 공유 결합될 수 있다. 이렇게, 본 명세서에 기술된 착물은 항체 또는 항체 단편에 공유 결합될 수도 있으며, 본

명세서에서는 결합물로 나타낸다.

본 명세서에 기술된 결합물에 사용될 수 있는 항체 또는 항체 단편은 본 분야에 잘 알려진 기법에 의해 제조할 수 있다. 강한 특이성의 모노클론성 항체는 본 분야에 알려진 교잡 기법(예를 들면 쾨러(Khler) 및 밀스타인(Milstein)의 논문[Nature 256, 495-497, (1975) 및 Eur. J. Immunol. 6, 511-519 (1976)]참조)에 의해 제조할 수 있다. 상기 항체는 보통, 강한 특이 반응성을 갖는다. 방사성 금속 이온 결합물을 표적으로 하는 항체로, 원하는 항원 또는 합텐(hapten)에 대항하는 항체를 사용할 수도 있다. 방사성 금속 이온 결합물에 사용되는 항체는 목적하는 에피토프에 대해 강한 특이성을 갖는 모노클론성 항체 또는 그 단편이 바람직하다. 본 발명에 사용된 항체는, 종양, 박테리아, 곰팡이, 비루스, 기생충, 마이코플라즈마, 변이, 및 다른 세포 막 항원, 병원체 표면 항원, 독소, 효소, 알레르겐, 의약품 및 모든 생물학적 활성분자에 대항할 수 있다. 항체 및 항체 단편의 몇몇 예로는 CC-11, CC-15, CC-30, CC-46, CC-49 F(ab')₂, CC-49, CC-83, CC-83 F(ab')₂, CC-92 및 B72.3 이 있다.(CC-49, CC-83 및 B72.3 항체에 대해서는 콜처(D. Colcher)등의 논문[Cancer Res. 48, 4597-4603, 1988년 8월 15일]을 참조하시오). 하기 CC항체들은 하기와 같이 ATCC에 기탁되었다 : CC-11은 HB 9455로서; CC-15는 HB 9460으로서; CC-30은 HB 9457로서; CC-46은 HB 9458로서; CC-49는 HB 9459로서; CC-83은 HB 9453으로서; 및 CC-92는 HB 9454로서 부착되었다. B72.3은 ATCC에 HB 8108로서 기탁되었다. 항원에 대한 보다 자세한 내용은 미합중국 특허 제4, 193,983호에 나와 있다. 본 발명의 방사성 금속 이온 킬레이트/항체 결합물은 여러가지 암의 진단 및 치료에 특히 바람직하다.

본 발명의 바람직한 희토류(란탄족 또는 가(pseudo)-란탄족) 착물은 하기 일반식(IV)로 나타내어진다.

화학식 4



상기식에서,

Ln은 Ce³⁺, Pr³⁺, Nd³⁺, Pm³⁺, Sm³⁺, Eu³⁺, Gd³⁺, Tb³⁺, Dy³⁺, Ho³⁺, Er³⁺, Tm³⁺, Yb³⁺ 및 Lu³⁺ 와 같은 희토류 금속(란탄족) 이온, 또는 Sc³⁺, Y³⁺ 및 La³⁺ 와 같은 가-란탄족 금속이온 이고; BFC는 이작용성 킬란트를 나타내며; C는 전체 착물을 중성으로 만들기 위해 충분한 전하를 가진 약제학적으로 허용가능한 이온 또는 이온의 그룹을 나타낸다.

만일 BFC가 음성전하의 잔기 4개 이상을 함유하면, C는 H⁺, Li⁺, Na⁺, K⁺, Rb⁺, Cs⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Sr²⁺, Ba²⁺, Ra²⁺, NH₄⁺, N(CH₃)₄⁺, N(C₂H₅)₄⁺, N(C₃H₇)₄⁺, N(C₄H₉)₄⁺, As(C₆H₅)₄⁺, [(C₆H₅)₃P=]N⁺ 및 기타 양자화된 아민과 같은 양이온 또는 양이온들의 그룹이다. 만일 BFC가 음전하의 잔기 3개를 함유하면, C는 필요하지 않다. 만일 BFC가 음전하의 잔기 2개를 함유하면, C는 F⁻, Cl⁻, Br⁻, I⁻, ClO₄⁻, BF₄⁻, H₂PO₄⁻, HCO₃⁻, HCO₂⁻, CH₃SO₃⁻, H₃C⁻, C₆H₄-SO₃⁻, PF₆⁻, CH₃CO₂⁻ 및 B(C₆H₅)₄⁻ 와 같은 음이온이다.

본 발명은 생리학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 그의 배히클과 함께 사용된다. 그러한 제제의 제조방법은 잘 알려져 있다. 상기 제제는 현탁액, 주사 용액, 또는 기타 적합한 제형일 수도 있다. 보조제와 함께 또는 보조제 없이, 생리학적으로 허용가능한 현탁매질을 사용할 수도 있다.

제제의 효과량을 치료에 사용한다. 투여량은 치료할 질병에 따라 다를 것이다. 본 발명의 제제를 사용하여 시험관내에서 진단을 수행할 수도 있지만, 또한 본 발명의 제제를 사용하여 생체내에서 진단을 수행할 수도 있다. 본 발명의 결합물 및 제제는 또한 방사선면역성 유도 외과(Radiolmmuno Guided Surgery; RIGS)에 사용될 수 있다; 그러나, 이 목적에 사용될 수 있는 기타 금속에는 또한 ^{99m}Tc, ¹¹¹In, ^{113m}In, ⁶⁷Ga, 및 ⁶⁸Ga 이 포함된다.

본 발명의 킬란트-방사성핵종 착물을 골 암의 치료에 사용하는 경우에는 특정 제한이 있어야 한다. 방사성핵종의 성질이 중요하지만, 방사성핵종-킬란트 착물을 함유하는 조성물의 전체 성질이 결정인자이다. 어떠한 하나의 성질의 불리한 점은 조성물에 사용된 리간드 또는 방사성핵종, 및 그의 결합물의 우수한 하나 이상의 성질에 의해 극복될 수 있다는 것을 고려하여야 한다.

하기 내용은, 본 발명의 조성물에 사용된 방사성 핵종의 어떠한 특정 결합물(즉, 착물) 및 리간드를 선택하는데 있어서 고려하여야 하는 제한점을 설명하는 것이다. 방사성핵종-킬란트 착물은 본 발명에 사용된 적합한 과량의 리간드없이 사용된 경우, 치료에 효과적이거나 유용하지 않을 수도 있다.

따라서, 연조직에 최소용량을 제공하면서 석회화 종양에 치료용 방사선 용량을 제공하는 것이 가능하게 하는 하기 제한점을 가진 조성물이 필요하다.

방사성핵종은 바람직하게는 연조직보다는 오히려 골에 제공되어야 한다. 보다 특히, 간 또는 혈액에 흡수되는 것은 바람직하지 못하다.

상기 조직에 대한 불필요한 손상을 피하기 위해서는, 방사성핵종이 비-골성조직으로부터 신속하게 제거되어야 한다. 예를 들면, 혈액으로부터 신속하게 제거되어야 한다.

본 발명의 몇가지 조성물의 제안된 용도는 동물의 석회화 종양의 치료이다. 본 명세서에 사용된 석회화 종양이란 용어는 1차 종양(골격계가 병발의 1차 부위이다) 및 전이성 골암(네오플라즘이 전립선 및 유방과 같은 다른 1차 부위로부터 골격계로 확산됨)을 포함한다. 본 발명은 방사선 치료용량을 제공함으로써, 석회화 종양의 진통을 경감시키고/시키거나, 크기를 감소시키고/시키거나, 성장 및/또는 확산을 억제하고/하거나, 퇴행을 유발하고/하거나, 그것을 파괴하는 수단을 제공한다.

상기 조성물은 1회 용량으로서 또는 보다 긴 기간에 걸쳐 여러회 용량으로서 투여할 수도 있다. 종양에 방사성 핵종을 전달하는 것은 상기에 나타난 이점을 제공하기에 충분한 양으로 하여야 한다.

본 발명의 몇개의 킬란트의 기타 용도에는, 신체로부터 바람직하지 못한 금속(즉, 철)의 제거, 자기 공명 영상화, 여러 목적을 위해 예를 들면 진단제로서 중합체성 지지체에의 결합, 및 선택적 추출에 의한 란타넘 금속 또는 가-란타넘 금속이온의 제거가 포함될 수 있다. 또한, 석회화 부위로 방사성핵종을 전달하는데 사용된 금속-리간드 착물을 골수의 제거(즉, 골수 이식)에 이용할 수 있다.

방사성핵종은 여러가지 방법으로 제조할 수 있다. 핵 반응기에서, 핵종에 중성자로 충격을 가해 방사성 핵종을 얻는다(예를 들면, $Sm - 152 +$ 중성자 $- Sm - 153 +$ 감마선).

방사성핵종을 얻는 또다른 방법은 선형 가속기 또는 사이클로트론에 의해 생성된 입자로 핵종에 충격을 주는 것이다. 또다른 방법은 핵분열 생성물의 혼합물로부터 방사성핵종을 분리하는 것이다. 본 발명에 사용된 핵종을 얻는 방법은 이에 제한을 두지 않는다.

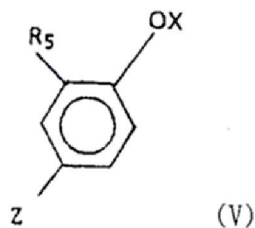
본 명세서에 기술된 킬레이트제는 본 분야에 잘 알려진 방법으로 제조할 수 있다. 예를 들면, 문헌[Chelating Agents and Metal Chelates, Dwyer Mellor, Academic Press (1964), chapter 7]을 참조하시오. 또한, 문헌[Synthetic Production and Utilization of Amino Acids, (가메고(Kameko)등에 의해 편집됨) John Wiley Sons (1974)]에서의 아미노산 제조방법을 참조하시오.

Z(일반식(I)에서의)이 친핵성 잔기로 선택된 경우, 그것은 본 분야에 알려진 방법에 의해 제조할 수 있다. 상기 방법은 논문[Acc. Chem. Res. 17. 202-209 (1984)]에서 찾을 수도 있다.

일반식(I), (II) 또는 (III)의 킬란트를 제조하는데 사용될 수 있는 몇가지 방법의 예를 들면,

(A) 20°C 이하의 온도에서, 가성화합물 및 적합한 용매의 존재하에, 하기 일반식(V)의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을, 화합물 B(여기에서, B는 최소한 하나의 아민 수소를 가진 선형 또는 분지형 아민, 또는 폴리알킬렌 아민이다), 및 알데히드 또는 알데히드 전구체 등가물과 반응시킨 다음, 가열하여, 일반식(I), (II) 또는 (III)의 목적 생성물을 분리하는 단계:

화학식 5



(상기식에서, Z는 항체 또는 그의 단편에 공유 결합될 수 있는 친전자성 또는 친핵성 잔기, 또는 방사성 핵종과의 착물화를 방해하지 않고 항체 또는 그의 단편에 결합될 수 있는 합성 결합기이고, X는 수소이며 R₅는 수소, 또는 (CR₁R₂)_nCR₃R₄T (이때, R₁, R₂, R₃ 및 R₄는 각각 독립적으로 수소, 하이드록시, CO₂H 또는 C₁ 내지 C₃ 알킬 그룹이고, n은 0 또는 1이며, T는 선형 또는 분지형 아민, 또는 아민 수소의 최소한 하나가 CR₃R₄CO₂H 그룹으로 치환된 폴리알킬렌 아민이다)이다;

(B) 20°C 이하의 온도에서, 가성화합물의 존재하에, pH 9 이상에서 단계(A)로부터 수득된 생성물을 할로-(CR₁R₂)_nCR₃R₄ 산과 반응시켜, 일반식(I), (II) 또는 (III)의 화합물(이때, R₁, R₂, R₃ 및 R₄ 중 최소한 하나는 CO₂H 이다)을 제조하는 단계;

(C) 단계(B)의 생성물(이때, Z는 NHC(O)CH₃이다)을 물중의 NaOH로 가수분해하여, 일반식(I), (II) 또는 (III)의 생성물(이때, Z는 NH₂이다)을 제조하는 단계;

(D) 20°C 이하의 온도에서, 가성화합물 존재하에, pH 9 이상에서, 단계(A)로부터 수득된 생성물을 글리콜로 니트릴과 반응시킨 후, 물중의 HCl로 시아노그룹을 가수분해하여, 일반식(I), (II) 또는 (III)의 생성물(이때, R₁, R₂, R₃ 및 R₄ 중 최소한 하나는 CO₂H이다)을 제조하는 단계;

(E) 단계(A)의 생성물(이때, Z는 NHC(O)CH₃이다)을 가열하면서 D₂O 중의 DCl로 가수분해하여 일반식(I), (II) 또는 (III)의 생성물(이때, Z는 NH₂이다)을 제조하는 단계; 및

(F) 단계(A) 내지 (E)중의 어느 한 단계로부터 수득된 생성물(이때, Z는 NH_2 이다)을 티오포스겐과 반응시켜, 일반식(I), (II) 또는 (III)의 생성물(이때, Z는 이소티오시아네이트이다)을 제조하는 단계이다.

상기 여러단계들의 반응 조건 및 시약은 하기와 같다. 온도가 20℃ 이하인 경우, 이것은 보통 빙-수욕을 사용하여 얻는다. 가열은 환류온도 또는 실온 이상에서 행해진다. 바람직한 가성화합물은 수산화 나트륨이지만, 반응으로부터 형성된 생성물에 나쁜 영향을 미치지 않으면서 목적 pH를 얻을 수 있는 모든 적합한 염기가 허용된다. 적합한 용매는 불활성이고, 반응물에 가용성을 제공하는 것이며, 그러한 용매의 예를 들면, 물 및 메탄올과 같은 알콜이 있다. 목적 생성물은 통상의 방법, 예를 들면 아세톤과 같은 용매로부터의 침전에 의해 분리할 수 있다.

일반식(I), (II) 또는 (III)의 착물은 통상의 방법에 의해, 예를 들면 금속이 킬란트에 의해 은폐되도록 하는 조건하에 킬란트를 금속과 반응시킴으로써 제조한다. 주로, 킬란트는 금속에 비해 과량이다.

일반식(I), (II) 또는 (III)의 결합물은 통상의 방법에 의해, 예를 들면 착물을 항체 또는 항체 단편에 공유 결합시킴으로써 제조한다.

하기 실시예들을 참조로 하면 본 발명이 더 명확해질 것이며, 하기 실시예들은 본 발명의 용도를 단지 설명하기 위한 것이다. 일반식(I)에 관련된 화합물의 구조를 표 I 에 나타내었다.

[출발 물질의 제조]

[실시예A]

비대칭성 에틸렌디아민디아세트산의 제조

반응용기에 탈이온수(60.6g), 98% N-아세틸에틸렌디아민(20.4g, 0.2몰), 및 브로모아세트산(55.7g, 0.40 몰)을 가하고 빙-수욕에서 냉각시켰다. 혼합물을 교반하면서, 25% 수산화나트륨 용액을 사용하여 pH 를 약 8.1로 조정하였다. 가성 용액을 첨가하는 동안 혼합물의 온도를 20℃ 미만으로 유지하였다. 빙-수욕을 제거하고, 25% 수산화나트륨 용액을 첨가하여 pH를 7 내지 8로 유지하였다. 주기적으로 빙-수욕으로 냉각시킴으로써 온도를 37℃ 미만으로 조절하였다. 반응 혼합물을 교반하고 상기와 같이 약 31시간동안 유지한 다음, 수-냉각되는 환류냉각기, 자기교반봉, 온도계, 첨가용 깔때기 및 가열 맨틀이 구비된 환저반응 플라스크로 옮겼다. 수산화 나트륨 용액(50% 용액 40.1g)을 가하고, 혼합물을 교반하면서 약 15시간동안 환류하에 가열한 다음, 냉각시키고, 중급 유리 프리트 깔때기 및 진공을 사용하여 여과하였다. 여액을 정량적으로 비이커로 옮기고(탈이온수를 사용하여), 빙욕에서 25℃ 미만으로 냉각시켰다. 교반하면서 탈이온수(100ml)를 가하고, 25℃ 미만의 온도로 유지하면서 진한 염산을 사용하여 pH를 약 4로 조정하였다. 중급 유리 프리트 깔때기 및 진공을 사용하여 혼합물을 여과하였다. 큰 비이커에 에탄올 약 1200 ml를 가하고, 자기교반봉으로 교반하였다. 상기로부터의 여액을 완전히 혼합하면서 에탄올에 가하였다. 오일성 물질이 형성되어 점차적으로 백색 고형물로 변화하였다. 2시간동안 교반을 계속하고, 이때, 중급 유리 프리트 깔때기 및 진공을 사용하여 여과함으로써 고형물을 수거하였다. 고형물을 약 1.5시간동안 공기에 노출시켜 건조한 후, 진공 오븐에 넣어 수시간동안 55 내지 60℃하에 건조하였다. 무기염을 함유하는 백색 고형물 약 42.9g을 수거하여, H 및 C NMR에 의해 비대칭성 에틸렌디아민 디아세트산임을 확인하였다.

[실시예B]

2-옥소-1-피페라진아세트산; 에틸렌디아민디아세트산의 락탐의 제조

온도계, 온도 조절기, 수-냉각되는 환류 냉각기 및 가열맨틀이 구비된 환저반응 플라스크에 탈이온수(150g), 대칭성 에틸렌디아민디아세트산 25.0g(0.14몰), 및 진한 염산 28g을 가하였다. 자기교반봉을 사용하여 혼합물을 교반하고, 4시간동안 환류하에 가열한 후 냉각시켰다. 중급 유리 프리트 깔때기 및 진공을 사용하여 내용물을 여과하였다. 50% 수산화나트륨 용액을 사용하여 여액의 pH를 약 1.5로 조정하고, 중급 유리 프리트 깔때기 및 진공을 사용하여 여과하였다. 50% 수산화나트륨 용액을 사용하여 여액의 pH를 약 5로 조정하고, 60 내지 70℃의 온도에서 휘발물을 제거하였다(진공하에). 진공 오븐에서 55 내지 60℃ 하에 수시간동안 고형물을 건조시켰다. H 및 C NMR에 의해 대칭성 에틸렌디아민디아세트산의 락탐임을 확인하였다.

[실시예C]

2-옥소-1,4-피페라진디아세트산; 에틸렌디아민트리아세트산의 락탐의 제조

비이커에 실시예B의 공정에 의해 제조된 2-옥소-1-피페라진아세트산 약 40.8g, 및 탈이온수 70g을 가하고, 자기교반봉으로 수시간동안 교반하였다. 중급 유리 프리트깔때기 및 진공을 사용하여 내용물을 여과하였다. 비이커에 여액 및 브로모아세트산 20.0g을 가하고, 브로모아세트산이 모두 용해될 때까지 교반하였다. 25% 수산화나트륨 용액을 사용하여 pH를 약 7로 조정하였다. 가성 용액을 첨가하는 동안 빙-수욕에서 냉각시킴으로써 혼합물의 온도를 25℃ 미만으로 유지하였다. 빙-수욕을 제거하고, 25% 수산화나트륨 용액을 주기적으로 첨가하여 pH를 약 7로 유지하면서 약 35℃에서 약 4 내지 5시간동안 혼합물을 교반하였다. 반응 혼합물을 수시간동안 정치한 후, 약 90 내지 100g의 중량까지(진공에서) 농축시켜, 중급 유리 프리트 깔때기 및 진공을 사용하여 여과하였다. 55 내지 60℃의 온도에서 여액으로부터 휘발물질을 제거하고(진공에서), 진공 오븐에서 55 내지 60℃하에 수시간동안 그 물질을 건조시켰다. H 및 C NMR에 의해 에틸렌디아민트리아세트산의 락탐임을 확인하였다.

[실시예D]

삼나트륨 에틸렌디아민트리아세트산의 제조

비이커에 실시예C의 공정에 의해 제조된 2-옥소-1,4-피페라진디아세트산 약 44.5g, 및 탈이온수 280g을 가하고, 락탐이 용해될 때까지 교반하였다. 교반하면서 가성용액(110g, 50%)을 가하였다. 빙욕에서 냉각

시켜 온도를 25℃ 미만으로 유지하였다. 다음으로, 용액을 함유하는 관을, 87℃로 조절된 수욕에 담그어 가수분해시켰다. 15분 후에, 용액을 꺼내어 빙-수욕에서 냉각시켰다. H 및 C NMR에 의한 분석으로, 알카리성 가수분해 매질내에 삼나트륨 에틸렌디아민트리아세트산이 존재함을 확인하였다.

[실시예D]

4-디에틸렌트리아민아세트산의 제조

수-냉각되는 환류 냉각기, 자기교반봉 및 온도계가 구비된 플라스크에 프탈산 무수물 75.0g, 아세트산 350.5g 및 디에틸렌트리아민 26.0g을 가하였다. 혼합물을 교반하고 약 116℃에서 1.5시간동안 가열한 다음, 냉각시켰다. 218g의 중량이 수득될 때까지 진공하에 65내지 70℃에서 휘발물질을 제거하였다. 교반 하면서 혼합물을 에탄올 600g에 부었다. 2시간 후, 중급 유리 프리트 깔때기를 사용하여 고형물을 여과하였다. 고형물을 에탄올 500ml로 2회 세척한 다음, 진공 오븐에서 60 내지 65℃하에 건조하였다. 디프탈로일 배합 물질 약 66g을 수거하였다.

수-냉각되는 환류 냉각기, 첨가용 깔때기, 기계적 교반기 및 온도 조절기를 가진 온도계가 구비된 플라스크에, 상기에서 제조된 디프탈로일 배합물 65.6g, 탄산나트륨 17.7g, 및 에탄올 800ml를 가하여 디프탈로일 배합물의 에틸 에스테르를 제조하였다. 교반된 혼합물에 15분 동안에 걸쳐 에틸 브로모아세테이트(51.0g)을 가한 다음, 환류하에 16시간동안 가열하였다. 딘-스타크(Dean-Stark) 증류 트랩을 사용하는 증류법에 의해 에탄올(200ml)를 제거하고, 얼음 조각을 첨가하여 나머지 반응 혼합물을 5℃ 미만으로 냉각시켰다. 빙욕에서 추가의 5시간동안 혼합물을 냉각시킨 다음, 중급 유리 프리트 깔때기를 사용하여 여과하였다. 고형물을 에탄올로 2회 세척하고 진공오븐에서 65 내지 70℃ 하에 건조하였다. 에틸 1,7-디프탈로일-4-디에틸렌트리아민아세테이트 약 81g을 수득하였다. 물 30.32g 및 진한 염산 76.4g에, 에틸 1,7-디프탈로일-4-디에틸렌트리아민아세테이트 20.1g(0.045몰)을 93℃로 가열하면서 용해시키고, 혼합물을 93℃에서 6.5시간동안 유지하였다. 생성된 백색 침전물을 여과하고 물로 세척하였다. 합한 여액을 진공하에 60℃에서 농축시켜 백색 고형물을 얻었다. NMR 분석은, 프탈로일 그룹이 완전히 가수분해되지는 않았음을 나타내었다. 다음으로, 두가지의 고형물을 합하고, 소량의 물을 가진 진한 염산을 가하였다. 다음에, 슬러리를 6시간동안 가열하여 환류시키고, 실온으로 냉각시킨 다음 여과하여 프탈산 12.3g을 얻었다. 다음에, 진공하에 여액을 농축시켜 황색 고형물로서의 생성물 13.3g을 얻었다. 50% 수산화나트륨 6g을 첨가하여 생성물을 물에 용해시키고, 100℃에서 활성탄으로 처리한 다음 진공하에 여과 및 농축시켜 4-디에틸렌트리아민아세트산 15.2g을 얻었다.

[최종 생성물의 제조]

[실시예1]

2-[(2-[[비스(카복시메틸)]아미노]에틸]아미노]-2-(5-아세트아미도-2-하이드록시페닐)-에탄산의제조

비이커에 탈이온수(10.3g), 98% 4-아세트아미도페놀(15.1g, 0.1몰), 50% 수성 글리옥살산(14.8g, 0.1몰), 및 메탄올(50.5g)을 가하고, 자기교반봉을 사용하여 혼합하였다. 실시예A의 공정에서 제조된 비대칭성 에틸렌디아민디아세트산(19.5g)을 가하고, 그 혼합물을 빙-수욕에서 냉각시켰다. 혼합물을 교반하면서, 50% 수산화나트륨 용액을 사용하여 pH를 약 8.0으로 조정하였다. 가성 용액을 첨가하는 동안 혼합물의 온도를 20℃ 미만으로 유지하였다. 빙-수욕을 제거하고, pH를 8.7로 조정하여, 약 2시간동안 25 내지 32℃에서 교반하였다. 혼합물을 수-냉각되는 환류냉각기, 자기교반봉, 온도계, 및 가열맨틀이 구비된 환저 반응 플라스크로 옮겼다. 혼합물을 교반하면서 70℃에서 8시간동안 교반하에 가열한 다음, 냉각시키고, 중급 유리 프리트 깔때기 및 진공을 사용하여 여과하였다. 고형물을 7시간 동안 공기에 노출시켜 건조한 후, 진공 오븐에 넣어 수시간동안 55 내지 60℃에서 건조하였다. 고형물 약 29.6g이 회수되었다. 다음에, 그 물질을 아세톤 약 300g과 교반하여, 중급 유리 프리트깔때기 및 진공실을 사용하여 여과하였다. 그 고형물을 다시 추가의 아세톤 300g으로 세척하고, 공기건조한 다음, 진공 오븐에서 55 내지 60℃하에 1시간 동안 두었다. 2-[(2-[[비스(카복시메틸)]아미노]에틸]아미노]-2-(5-아세트아미도-2-하이드록시페닐)-에탄산, 나트륨염 약 26.7g을 얻었다. 이 고형물 및 탈이온수 180g을 비이커에 넣어 자기교반봉으로 교반하였다. 진한 염산으로 pH를 2.2로 조정하였더니, 그때 산 형태의 생성물이 용액으로부터 침전되기 시작하였다. 여과에 의해 생성물을 수거하고, 탈이온수 약 150g으로 세척하였다. 생성물, 2-[(2-[[비스(카복시메틸)]아미노]에틸]아미노]-2-(5-아세트아미도-2-하이드록시페닐)-에탄산을 진공오븐에서 55 내지 60℃하에 수시간동안 건조하였다. 생성물 약 14.2g을 얻었다. H NMR로 생성물의 구조를 확인하였다(표1 참조).

[실시예2]

2-[(2-[[비스(카복시메틸)]아미노]에틸](카복시메틸)아미노]-2-[5-아세트아미도-2-(카복시메틸옥시)페닐]-에탄산의 제조

작은 반응 용기에 탈이온수(4.5g), 브로모아세트산(2.0g), 및 실시예1의 공정에 의해 제조된 2-[(2-[[비스(카복시메틸)]아미노]에틸]아미노]-2-(5-아세트아미도-2-하이드록시페닐)-에탄산(2.5g)을 가하고, 빙-수욕에서 냉각시켰다. 혼합물을 교반하면서, 25% 수산화나트륨 용액을 사용하여 pH를 약 9.3으로 조정하였다. 가성 용액을 첨가하는 동안 혼합물의 온도를 20℃ 미만으로 유지하였다. 빙-수욕을 제거하고, 25% 수산화나트륨 용액을 주기적으로 첨가하여 그 혼합물을 pH 10.5 내지 11.5로 유지하면서 약 48시간동안 35 내지 40℃에서 교반하였다. 반응 혼합물의 일부(10.2g)를 비이커에 가하고 자기교반봉으로 교반하였다. 그 용액에 15분 동안에 걸쳐 아세톤(125g)을 가하였더니 오일의 침전물이 형성되었다. 아세톤 부를 경사분리함으로써 제거하고, 침전물에 추가의 아세톤 50g을 가하여, 혼합한 다음, 아세톤 층을 제거하였다. 오일을 공기 건조한 다음, 진공오븐에서 60 내지 65℃ 하에 약 2시간동안 건조하여 파삭파삭한 황색 고형물을 얻었다. 15mm x 500mm 컬럼상의 파마시아 인코포레이티드(Pharmacia Inc.)의 Q-세파로스™ (Sephacrose™)상에서 3ml/분의 속도로 2시간에 걸쳐 0 내지 30% 포름산을 구배 용출시키고 분획물을 수거하는 음이온 교환 크로마토그래피에 의해 생성물을 정제하였다. 그 분획물의 UV 흡광도를 관

측하여, 적합한 분획물을 합하고 동결 건조하여 목적 생성물을 수득하였다(표1 참조).

[실시예3]

2-[(2-[[비스(카복시메틸)]아미노]에틸](카복시메틸)아미노)-2-[5-아미노-2-(카복시메틸옥시)페닐]-에탄산, 5 나트륨염의 제조

D₂O 700 μ l에 실시예2의 공정에 의해 제조된 2-[(2-[[비스(카복시메틸)]아미노]에틸](카복시메틸)아미노)-2-[5-아세트아미도-2-(카복시메틸옥시)페닐]에탄산 약 40mg을 용해시키고, NaOD/D₂O 을 사용하여 pH 13으로 조정하였다. 주위온도에서 N-아세트 그룹을 상응하는 아닐린 작용기로 가수분해시킨 다음, H NMR에 의해 구조를 확인하였다(표1 참조).

[실시예4]

2-[(2-[[비스(카복시메틸)]아미노]에틸](시아노메틸)아미노)-2-[5-아세트아미도-2-(하이드록시페닐)에탄산의 제조

작은 유리 용기에, 탈이온수(3.1g) 및 실시예1의 공정에 의해 제조된 2-[(2-[[비스(카복시메틸)]아미노]에틸]아미노)-2-(5-아세트아미도-2-하이드록시페닐)-에탄산 2.5g을 가하고 빙-수욕에서 냉각시켰다. 25% 수산화나트륨 용액을 사용하여 pH를 9.8 내지 9.9로 조정하였다. 가성용액을 첨가하는 동안 혼합물의 온도를 20 $^{\circ}$ C 미만으로 유지하였다. 방울을 없애고, 혼합하면서 40% 글리콜로니트릴 수용액 1.0g을 가하고, 25% 수산화나트륨 용액을 사용하여 pH를 9.9 내지 10.0으로 조정하였다. 온도 조절기를 포함한 온도계, 수냉각되는 환류 냉각기, 및 가열 맨들이 구비된 작은 반응 플라스크에 그 혼합물을 넣었다. 반응 혼합물을 자기교반봉으로 교반하고, 8시간 동안 49 내지 50 $^{\circ}$ C 하에 가열한 다음, 냉각하고 주위온도에서 72 시간동안 정치시켰다. 반응 혼합물의 일부(8.5g)를 비이커에 가하고 자기교반봉으로 교반하였다. 그 용액에 10분 동안에 걸쳐 아세톤(146g)을 가하여, 고형 물질을 침전시켰다. 아세톤 부를 경사분리함으로써 제거하고, 침전물에 추가의 아세톤 50g을 가하고, 혼합한 다음, 아세톤 층을 제거하였다. 그 물질을 진공 오븐에서 60 내지 65 $^{\circ}$ C 하에 약 4시간 동안 건조하였다. 생성물 약 2.9g을 얻었다. H NMR은 목적하는 아미노아세토니트릴 유도체임을 뒷받침해주었다(표1 참조).

[실시예5]

2-[(2-[[비스(카복시메틸)]아미노]에틸](카복시메틸)아미노)-2-(5-아미노-2-하이드록시페닐)-에탄산의 제조

실시예4의 공정에 의해 앞에서 제조된 2-[(2-[[비스(카복시메틸)]아미노]에틸](시아노메틸)아미노)-2-[5-아세트아미도-2-(하이드록시페닐)에탄산 약 1.0g을 산성 조건하에 가수분해하여, 아미노아세토니트릴 작용기를 상응하는 아세테이트 그룹으로, N-아세트 그룹을 아닐린 그룹으로 전환시켰다. 유리관에 아미노아세토니트릴 화합물, D₂O 2.2g, 및 20% DCI 7.8g을 가하였다. 그 관을 88 내지 89 $^{\circ}$ C로 온도-조절된 수욕에 총 33분동안 둔 다음, 꺼내어 냉각시켰다. 가수분해한 후 H NMR로 측정하였다. 다음에, 그 용액을 냉동-건조(freeze-dried) 및 동결-건조(lyophilized)하여 고형물 1.3g을 얻었다. 15mm x 500mm 컬럼상에서, 3ml/분의 속도로 1시간에 걸쳐 0 내지 1M 아세트산으로 구배 용출시키고 6ml의 분획물을 수거하는 음이온 교환(Q-세파로즈[™])에 의해 그 생성물을 정제하였다. 그 분획물의 UV 흡광도를 관측하고, 적합한 분획물을 합하고 동결 건조하여 목적 생성물을 얻었다(표1 참조).

[실시예6]

2-[[비스(2-[[비스(카복시메틸)]아미노]에틸]아미노)-2-[5-아세트아미도-2-(카복시메틸옥시)페닐]에탄산, 및 2-[[2-2-[[비스(카복시메틸)]아미노]에틸](카복시메틸)아미노]에틸](카복시메틸)아미노)-2-[5-아세트아미도-2-(카복시메틸옥시)페닐]에탄산의 제조

비이커에 탈이온수(24.8g), 98% 4-아세트아미도페놀 15.1g(0.1몰), 및 50% 수성 글리옥살산 14.8g(0.1몰)을 가하고 빙-수욕에서 냉각시켰다. 온도를 20 $^{\circ}$ C 미만으로 유지하는 동안, 25% 수산화나트륨을 사용하여 혼합물의 pH를 3.3으로 조정하였다. 다음으로 DETA(9.8g)을 가하였다. 다시한번, 빙-수욕에서 냉각 시킴으로써 온도를 20 $^{\circ}$ C 미만으로 유지하였다. DETA 첨가후의 pH는 약 10.2였다. 그 혼합물을, 온도계, 온도조절기, 수-냉각되는 환류 냉각기, 및 가열 맨들이 구비된 반응 플라스크로 옮겼다. 자기교반봉을 사용하여 반응 혼합물을 교반하고, 75 $^{\circ}$ C에서 약 7 시간동안 가열하고, 냉각하였다. 큰 비이커에 아세톤(1400g)을 가하고, 자기교반봉으로 교반하였다. 10분 동안에 걸쳐 상기에서 제조한 반응용액 약 40g을 가하여 고형물질을 침전시켰다. 아세톤 부를 경사분리함으로써 제거하고, 추가의 아세톤 1460g을 가하여 고형물을 연마하고, 아세톤하에 완전히 혼합하였다. 중급 유리 프리트 깔때기 및 진공을 사용하여 여과함으로써 고형물을 회수하였다. 그 고형물을 많은 양의 아세톤으로 세척하고, 진공 오븐에서 60 내지 65 $^{\circ}$ C의 온도하에 수시간동안 건조하였다. 고형물 약 7.8g을 회수하였으며, H NMR은 DETA 화합물의 목적하는 이성체의 혼합물임을 보여주었다.

비이커에 탈이온수(5.3g) 및 상기 분리된 고형물 4g을 가하고 자기교반봉으로 약 3시간 동안 교반하였더니, 그때 고형물이 완전히 용해되었다. 교반하면서 브로모 아세트산(10.1g)을 가하고 그 혼합물을 빙-수욕에서 냉각시켰다. 25% 수산화나트륨 용액을 사용하여 혼합물의 pH를 약 11로 조정하였다. 가성 용액을 가하는 동안 온도를 20 $^{\circ}$ C 미만으로 유지하였다. 빙-수욕을 제거하고, 25% 수산화나트륨 용액을 주기적으로 첨가하여 pH를 약 10.5 내지 11.5로 유지하면서 혼합물을 35 내지 40 $^{\circ}$ C의 온도에서 50시간동안 교반하였다. 비이커에 아세톤(240g)을 가하고 자기교반봉으로 교반하였다. 아세톤에 반응 용액 약 5g을 가하여 고형물을 침전시켰다. 아세톤 부를 경사분리하고, 추가의 아세톤 245g을 가하고 혼합한 후, 아세톤 층을 제거하였다. 중급 유리 프리트 깔때기 및 진공을 사용하여 여과함으로써 고형물을 수거하였다. 아세톤으로 고형물을 세척한 다음, 진공 오븐에서 55 내지 60 $^{\circ}$ C하에 수시간 동안 건조하였다. 고형물 약 2.6g이 수득되었다(표1 참조).

[실시예7]

2-[비스(2-[[비스(카복시메틸)]아미노]에틸)아미노]-2-[5-아미노-2-(카복시메틸옥시)페닐]에탄산, 및 2-[2-[[2-[[비스(카복시메틸)]아미노]에틸](카복시메틸)아미노]에틸](카복시메틸)아미노]-2-[5-아미노-2-(카복시메틸옥시)페닐]에탄산의 제조

D₂O 1.0g에, 실시예 6의 공정에 의해 제조된 2-[비스(2-[[비스(카복시메틸)]아미노]에틸)아미노]-2-[5-아세트아미도-2-(카복시메틸옥시)페닐]에탄산, 및 2

-[[2-[[2-[[비스(카복시메틸)]아미노]에틸](카복시메틸)아미노]에틸](카복시메틸)아미노]-2-[5-아세트아미도-2-(카복시메틸옥시)페닐]에탄산 약 376mg을 용해시키고, 37% DCI 5방울로 처리하였다. 다음에, 그 산성 용액을 80℃하에 2시간 동안 가열하였더니, 그때의 H NMR 스펙트럼은 아세트 아닐라이드 그룹이 거의 전부 아닐린 그룹과 아세트산으로 전환되었음을 나타내었다. 다음에, 그 용액을 드라이아이스 아세톤 욕에서 냉동시키고, 밤새 동결 건조하여, 목적하는 생성물을 등갈색 고형물로서 수득하였다(표1 참조).

[실시예8]

2-[[2-[[2-[[비스(카복시메틸)]아미노]에틸](카복시메틸)아미노]에틸](카복시메틸)아미노]-2-[5-아미노-2-(카복시메틸옥시)페닐]에탄산의 제조

물 40ml에 실시예 E의 공정에 의해 제조된 4-디에틸렌트리아민아세트산 8.0g을 용해시키고, 그 혼합물을 빙욕에서 냉각시켰다. 이 냉각된 용액에, 4-아세트아미도페놀 6.08g(0.04몰) 및 물중의 50중량% 글리옥실산 용액 5.95g(0.04몰)의 냉각된 용액을 가하였다. 빙욕을 사용하여 슬러리를 20℃ 미만으로 유지하면서, 50중량% 수산화 나트륨 용액 2.5ml 분량을 가하였다. pH 8.75의 생성된 슬러리를 서서히 80℃로 가열하여, 교반하면서 이 온도에서 4.5시간동안 유지한 다음, 밤새 냉각시켰다. 다음에, 그 용액을 진공하에 약 25ml 부피로 증발시키고, 아세톤 300ml를 가하였다. 생성된 고형물로부터 아세톤을 경사분리하였다. 고형물을 아세톤으로 수회 세척하고 건조시켜 짙은 색의 점착성 고형물로서의 생성물 26.1g을 얻었다. 이 용액의 26.05g 분량을 물 50ml에 용해시켰다. 이 용액에, 브로모아세트산 26.7g(0.192몰)을 용해시켰다. 생성된 용액을 빙욕에서 냉각시키고, 50중량%의 수산화 나트륨으로 pH를 10.5로 조정하여, 실온으로 가온한 다음, 46℃로 가열하였다. 약 23시간동안, 온도를 46℃로 유지하고, 50중량% 수산화나트륨을 가하여 pH를 10.5로 유지하였다. 다음에, 진공하에 부피를 50ml로 감소시켰다. 아세톤 500ml에 거세게 교반하면서 상기 농축된 용액을 가하고, 생성된 침전물을 침강시켰다. 아세톤을 경사분리하고, 추가의 아세톤 400ml를 가하여, 격렬하게 교반한 다음 경사분리하였다. 아세톤 100ml를 사용하여 동일한 방식으로 최종적으로 세척하였다. 진공하에 고형물을 건조하여 파삭파삭한 갈색 고형물 52.55g을 얻었다. 이 갈색 고형물 샘플 2.00g을 물 20ml에 용해시키고 진한 염산 1.48g으로 처리하였다. H NMR에 의한 분석이 N-아세틸 잔기가 완전히 가수분해되었음을 나타낼 때까지 이 용액을 80℃하에 가열하였다. 다음으로, 이 용액을 동결 건조하여 표제 생성물을 함유하는 갈색 고형물 2.13g을 수득하였다(표1 참조).

[실시예9]

2-[[2-[[2-[[2-[[비스(카복시메틸)]아미노]에틸](카복시메틸)아미노]에틸](카복시메틸)아미노]에틸](카복시메틸)아미노]-2-[5-아세트아미도-2-(카복시메틸옥시)페닐]에탄산, 및 2-[[2-[[2-[[비스(카복시메틸)]아미노]에틸](카복시메틸)아미노]에틸](2-[[비스(카복시메틸)아미노]에틸]아미노)-2-[5-아세트아미도-2-(카복시메틸옥시)페닐]에탄산의 제조

비이커에 탈이온수(12.5g), 98% 4-아세트아미도페놀 7.6g, 및 50% 글리옥실산 수용액(7.4g)을 가하고 빙-수욕에서 냉각시켰다. 온도를 20℃ 미만으로 유지하는 동안 혼합물의 pH를 25% 수산화나트륨 용액을 사용하여 3.6으로 조정하였다. 온도를 20℃미만으로 유지하면서 선형 트리에틸렌테트라아민(7.2g)을 가하였다. 트리에틸렌테트라아민을 첨가한 후의 pH는 약 10.6 이었다. 그 혼합물을, 온도조절기를 포함한 온도계, 수-냉각되는 환류 냉각기, 및 가열 맨들이 구비된 반응 플라스크로 옮겼다. 자기 교반봉을 사용하여 반응 혼합물을 교반하고, 80℃ 내지 83℃에서 약 4.5시간동안 가열하고, 냉각하였다. 비이커에 아세톤(175g)을 가하고, 자기교반봉으로 교반하였다. 반응 용액 약 12g을 가하여 오일을 침전시켰다. 아세톤 부를 경사분리함으로써 제거하고, 추가의 아세톤 175g을 가하여, 계속 교반하였다. 아세톤 부를 제거하고, 침전물을 진공 오븐에서 60 내지 65℃ 하에 수시간동안 건조하였다. 고형물 약 3.1g을 얻었다. 고형물을 아세톤 100ml에 슬러리화시켜, 철저히 혼합한 다음, 중급 유리 프리트 깔때기 및 진공을 사용하여 여과하였다. 다음에, 그 고형물을 추가의 아세톤 250ml로 세척하고, 다시한번 진공 오븐에서 60 내지 65℃의 온도하에 약 4시간동안 건조하였다. 고형물 약 2.0g을 회수하였으며, H NMR은 트리에틸렌테트라아민 이성체의 혼합물이 존재함을 나타내었다.

비이커에 탈이온수(2.0g) 및 상기 고형 생성물 1.86g을 가하고 1시간동안 교반하였더니 고형물이 대부분 용해되었다. 교반하면서 브로모아세트산(5.0g)을 가하고 그 혼합물을 빙-수욕에서 냉각시켰다. 혼합물의 pH를 약 10.5로 조정하고, 25% 수산화나트륨 용액을 주기적으로 첨가하여 pH를 약 10.5 내지 11.5로 유지하면서 혼합물을 35 내지 40℃의 온도에서 47시간동안 유지하였다. 비이커에 아세톤(130g)을 가하고 자기교반봉으로 교반하였다. 아세톤에 반응 용액 약 10.8g을 가하여 고형물을 침전시켰다. 아세톤 부를 경사분리하고, 침전물에 추가의 아세톤 150g을 가하여 혼합한 후, 아세톤 층을 제거하였다. 진공 오븐에서 60 내지 65℃하에 수시간동안 고형물을 건조하였다. 고형물 약 7.2g이 수득되었다(표1 참조).

[실시예10]

2,6-비스[[비스(카복시메틸)아미노](카복시)메틸]-4-(아세트아미도)페놀의 제조

비이커에 98% 4-아세트아미도페놀 38.6g, 98% 이미노디아세트산 35.3g, 메탄올 150ml, 50% 글리옥실산 수용액 38.5g, 및 탈이온수 30g을 가하였다. 그 혼합물을 빙-수욕에서 냉각시키고, 혼합하면서 50% 수산화나트륨 용액으로 pH를 약 9.4로 조정하였다. 가성 용액을 첨가하는 동안 온도를 30℃ 미만으로 유지하였다. 수냉각되는 환류냉각기, 온도계, 및 가열 맨들이 구비된 반응 플라스크로 혼합물을 옮겼다. 반응

혼합물을 약 74 내지 76℃로 가열하여, pH 를 관측하고, 50% 수산화나트륨 용액을 주기적으로 가함으로 써 pH를 8.7 내지 9.5로 유지하였다. 총 18시간동안 혼합물을 가열하였다. 이 기간동안 탈이온수 약 40g 을 가하였다. 냉각한 후, 중급 유리 프리트 깔때기 및 진공을 사용하여 반응 혼합물을 여과하였다. 이 여 액에 탈이온수(75g)을 가하고 주위온도(약 20 내지 25℃)에서 메탄올을 제거하였다(진공하에). 이 용액 을 수시간동안 정치시키고, 중급 유리 프리트 깔때기 및 진공을 사용하여 여과함으로써 용액으로부터 침전 된 고형물을 제거하였다. 여액 약 30g, 및 에틸 에테르 15g을 완전히 혼합한 다음, 에테르 층을 분리하 였다. 에틸 에테르 15g 및 10g을 연이어 사용하여 공정을 반복하였다. 염산 수용액으로 수성 층의 pH를 약 0.5로 조정하고 50 내지 55℃의 온도에서 휘발물을 제거하였다(진공에서). 고형물 약 13.5g을 수득하 였다. 고형물에 메탄올(75g)을 가하고 여과에 의해 불용성 염을 제거하였다. 메탄올을 제거하고(진공에 서), 진공오븐에서 70 내지 75℃하에 수시간동안 잔류 고형물을 건조하였다. 약간의 무기 염을 여전히 함유한 생성물을 H NMR에 의해 분석하여, 주로 비스-치환된 생성물임을 발견하였다(표1 참조).

[실시예11]

2,6-비스{[(2-[[비스(카복시메틸)]아미노]에틸)(카복시메틸)]아미노메틸}-4-(아세트아미도)페놀의 제조

실시예D의 공정에 의해 제조된 알칼리성 삼나트륨에틸렌디아민트리아세트산 용액을 빙옥에서 냉각시키 고, 교반하면서 염산을 가하여 약13.8의 pH를 얻었다. 산을 가하는 동안 온도를 35℃ 미만으로 유지하였 다. 주위 온도에서 휘발물질을 제거하여(진공에서) 210g의 총량으로 만들었다. 진공을 사용하여 중급 유 리 프리트 깔때기상에서 여과함으로써 고형물을 제거하였다. 여액을, 수-냉각되는 환류 냉각기, 자기교반 봉, 온도계, 온도조절기, 가열 맨틀, 및 첨가용 깔때기가 구비된 250ml의 환저 플라스크로 옮겼다. 염산 으로 pH를 약11로 조정하였다. 산을 가하는 동안 온도를 30℃ 미만으로 유지하였다. 혼합물을 약 40℃로 가열하고, 35분 동안에 걸쳐 첨가용 깔때기로부터 37% 포름알데히드 수용액 11.6g을 적가하였다. 반응 혼합물을 교반하고 추가의 30분동안 가열한 다음 냉각하였다. 25% 수산화나트륨 용액으로 용액을 약 9.8 의 pH로 조정하고, 첨가용 깔때기로 옮겼다. 비이커에 98% 4-아세트아미도페놀 10.3g, 탈이온수 25.2g, 및 25% 수산화나트륨 용액 9.5g을 가하였다. 완전히 용해될 때까지 혼합물을 교반하였다. 그 용액을 상 기에 기술한 바와같은 환저 플라스크로 옮기고, 가열 및 교반하기 시작하였다. 혼합물을 약65℃로 가열 하고, 이때, 약 1시간동안에 걸쳐 상기에서 제조한 포름알데히드 부가생성물 용액을 적가하였다. 반응물 을 교반하고, 추가의 12시간동안 65℃로 하에서 가열한 다음, 냉각하였다. 비이커에 아세톤(150g)을 가 하고 자기교반봉으로 교반하였다. 아세톤에 조 반응 혼합물 약10g을 가하여 오일성 물질을 침전시켰다. 아세톤 부를 경사분리하고, 침전물에 추가의 아세톤150g을 가하여 혼합하고, 아세톤 층을 제거하였다. 진공오븐에서 55 내지 60℃ 하에 수시간동안 그 물질을 건조시켰다. 약 3.1g의 고형물이 수득되었다. 최 소량의 물에 고형물 약 165mg을 용해시켜, Q-세파로즈™ (파마시아 인코포레이티드로부터 구입) 컬럼[1.5 cm x 50cm, 아세트산 염 형태]에 부하하여, 2ml/분으로 2시간에 걸쳐 0 내지 1M 아세트산 암모늄으로 구 배 용출시켰다. 300nm에서의 흡광도를 관측하였다. 생성물은 제3의 주피크에 포함되었다. 이것을 단리하 고 동결 건조하여 고형물 36.4mg을 얻었으며, 이것은 H 및 C NMR, 및 고속 원자 충격 질량 분광계에 의 해 2,6-비스{[(2-[[비스(카복시메틸)]아미노]에틸)(카복시메틸)]아미노메틸}-4-(아세트아미도)페놀로서 특징지워졌다(표1 참조).

[실시예12]

2,6-비스{[(2-[[비스(카복시메틸)]아미노]에틸)(카복시메틸)]아미노메틸}-4-(아미노)페놀의 제조

5mm NMR 관에, 실시예11의 공정에 의해 제조된 2,6-비스{[(2-[[비스(카복시메틸)]아미노]에틸)(카복시메 틸)]아미노메틸}-4-(아세트아미도)페놀 약 264mg을 넣고, D₂O(0.5ml)와 DCL(0.5ml, 20%)의 혼합물에 용해 시켰다. NMR 관을 열수욕(85℃)에 단시간동안 넣고, NMR에 의해 반응의 진행(아세트아미드 메틸 양자의 소멸 및 아세트산의 생성)을 관측하였다. 35분후에 반응을 완료하였다. 반응 혼합물을 동결 건조하여, 진한색의 고형 물질로서 조 아민 염산염을 수득하였다. 최소량의 물에 조 생성물을 용해시켜, Q-세파로 즈™ 컬럼[1.5cm x 50cm, 아세트산 염 형태]에 부하하여, 2ml/분으로 3시간에 걸쳐 0 내지 1M 아세트산 암모늄으로 구배 용출시켰다. 300nm에서의 흡광도를 관측하였다. 생성물은 제3의 주피크에 포함되었다. 이것을 단리하고 동결 건조하여, 목적하는 아민 생성물 및 염화 암모늄의 혼합물인 연한 황갈색 고형물(122mg)을 얻었다. 생성 혼합물은 H 및 C NMR, 및 원소분석에 의해 특징지워졌다. 염-함유 생성물(합한 배취로부터 250mg)을 4시간에 걸쳐 0 내지 10% 포름산으로 구배 용출시켜 Q-세파로즈™ (1.5 cm x 50cm, 포름산염 형태)상에서 더 정제하였다. 300nm에서의 흡광도를 측정하였다. 제1의 주 피크가 목적하는 생성물을 포함하였다. 이것을 단리하고 동결 건조하여 백색 결정성 고형물 8.3mg을 수득하였 다. H 및 C NMR, 및 고속 원자 충격 질량 분광계에 의해 구조를 확인하였다(표1 참조).

[실시예13]

2,6-비스{[(2-[[비스(카복시메틸)]아미노]에틸)(카복시메틸)]아미노메틸}-4-(이소티오시아네이트)페놀의 제조

실시예12의 공정에 의해 제조된 2,6-비스{[(2-[[비스(카복시메틸)]아미노]에틸)(카복시메틸)]아미노메 틸}-4-(아미노)페놀 및 무기염을 함유하는 생성물(208mg, NH₄Cl 중의 15%)을 최소량의 물에 용해시키고, 세파덱스™ (Sephadex™) G-10(파마시아 인코포레이티드)탈염용 컬럼(1cm x 35cm)을 통과시켰다. 물을 사 용하여 염이 없는 아민을 용출시키고, 동결 건조하였다(11.5mg). 물(10ml)에 아민을 용해시키고 환저 반 응 플라스크에 넣었다. 염화메틸렌(1ml)에 용해시킨 티오포스겐(0.015ml, 10당량)을 가하였다. 반응 혼 합물을 실온에서 1시간동안 교반하였다. 다음에, 혼합물을 염화메틸렌으로 수회 세척하여 과잉의 티오포 스겐을 제거하고, 수성 층을 동결 건조하여 조 이소티오시아네이트 생성물을 얻었으며, 이것은 고속 원 자 충격 질량 분광계에 의해 특징지워졌다(표1 참조).

[실시예14]

2-({비스(카복시메틸)}아미노)메틸)-4-(아세트아미도)페놀의 제조

수냉각되는 환류 냉각기, 기계적 교반기, 온도 조절기를 가진 온도계, 및 첨가용 깔때기가 구비된 환저 반응 플라스크에 탈이온수(35.3g), 98% 이미노디아세트산 35.3g(0.25몰), 및 50% 수산화나트륨 수용액 29.9g을 칭량부가하였다. 그 혼합물을 교반하면서 55°C의 온도로 가열하였다. 첨가용 깔때기에 37% 포름알데히드 수용액(21.5g)을 넣고 15분 동안에 걸쳐 반응 플라스크에 가하였다. 반응 혼합물을 약 45분 동안 55°C에서 가열하고, 냉각하여 첨가용 깔때기로 옮겼다. 상기와 같이 구비된 환저 플라스크에 98% 4-아세트아미도페놀 38.7g(0.25몰), 탈이온수 35.3g, 및 50% 수산화나트륨 수용액 12.2g을 가하였다. 혼합물을 교반하면서 약 65°C의 온도로 가열하고, 30분 동안에 걸쳐 포름알데히드-이미노디아세트산 부가생성물 용액을 가하였다. 반응 혼합물을 65°C하에 추가의 12시간동안 가열하고, 냉각하였다. 진한 염산(55.5g)을 가하고, 반응 혼합물을 1시간동안 교반하였다. 그 용액을 수주동안 정치시킨 다음, 결정성 침전물을 여과하고, 탈이온수로 세척하여, 진공 오븐에서 65°C 하에 수시간동안 건조하였다. 고품물 약 17.4g이 회수되었다. H NMR에 의해 구조를 확인하였다(표1 참조).

[실시예15]

2-({비스(카복시메틸)}아미노)메틸)-6-[[({비스(카복시메틸)}아미노)에틸](카복시메틸)아미노)메틸]-4-(아세트아미도)페놀의 제조

비이커에, 실시예C의 공정에 의해 제조된 조 2-옥소-1,4-피페라진디아세트산 약 5.7g 및 탈이온수 38.6g을 가하고, 락탐이 용해될 때까지 혼합하였다. 빙-수욕에서 냉각시킴으로써 온도를 30°C 미만으로 유지하면서, 가성 용액(50% 수산화나트륨 용액 13.5g)을 가하였다. 다음에, 그 용액을 유리관으로 옮겨 90°C 수욕에 10분 동안 담근 다음, 빙-수욕에서 냉각시켰다. H NMR에 의해 락탐이 에틸렌디아민트리아세트산의 삼나트륨염으로 전환된 것을 확인하였다. 다음으로, 염산을 가하여, 알칼리성 용액을 pH 약 11.9로 조정하였다. 빙-수욕에서 냉각함으로써 온도를 25°C 미만으로 유지하였다. 그 용액을 반응 용기로 옮겨, 20분 동안에 걸쳐 37% 포름알데히드 수용액 1.5g을 적가하였다. 이 동안에 pH조정을 위해 소량의 가성 수용액도 또한 가하였다. pH를 11.0 내지 11.5로 유지하기 위해 수성 수산화나트륨을 주기적으로 가하면서 추가의 한시간동안 혼합물을 교반하였다.

별도의 반응 용기에, 실시예12의 공정에 의해 제조된 2-({비스(카복시메틸)}아미노)메틸)-4-(아세트아미도)페놀 1.5g 및 탈이온수 2.5g을 가하였다. 빙욕에서 냉각시키면서 수성25% 수산화나트륨을 가하여 pH 약 11을 얻었다. 다음으로, 약 30°C의 온도에서 페놀성 화합물에, 30분 동안에 걸쳐 상기에서 제조한 포름알데히드 부가생성물 용액을 가하였다. 반응 혼합물을 혼합하고 추가의 10시간동안 70°C 하에 가열한 다음 냉각시켰다. 비이커에 아세톤(100g)을 가하고, 자기교반봉으로 교반하였다. 아세톤에 조 반응 혼합물 약 10g을 가하여 고무상 물질을 침전시켰다. 아세톤 부를 경사분리하고, 그 물질에 추가의 아세톤 50g을 가하여 그 생성물을 아세톤하에 연마하였다. 경사분리함으로써 아세톤 층을 제거하고, 그 고품물을 진공 오븐에서 60 내지 65°C 하에 수시간동안 건조하였다. 고품물의 수용액을 Q-세파로즈™ 컬럼위로 통과시키고 실시예 11 에서와 같이 목적 분획물을 단리함으로써, 조 혼합물로부터 목적 생성물을 단리하였다(표1 참조).

[실시예16]

N,N'-디(2-하이드록시-5-아세트아미도벤질)에틸렌디아민-N,N'-디아세트산의 제조(비교용)

수 냉각되는 환류 냉각기, 기계적 교반기, 온도 조절기를 갖춘 온도계 및 첨가용 깔때기가 구비된 환저 반응 플라스크에 에틸렌디아민-N,N'-디아세트산(10g,0.056몰), 탈이온수 25g, 50% 수산화나트륨 용액 7.0g 및 메탄올 5.0g을 가하였다. 반응 혼합물을 55°C로 가열하였다. 첨가용 깔때기에 37% 포름알데히드 수용액(9.2g, 0.11몰)을 칭량 부가하여, 20분 동안에 걸쳐 가하였다. 반응 혼합물을 55°C 하에 1시간동안 가열한 다음 냉각하여, 또다른 첨가용 깔때기로 옮겼다. 상기와 같이 구비된 반응 플라스크에 4-아세트아미도페놀 17.2g(0.11몰), 탈이온수 36g, 50% 수산화나트륨 용액 2.0g 및 메탄올 36g을 가하였다. 혼합물을 65°C로 가열하고, 1시간 15분 동안에 걸쳐 포름알데히드/에틸렌디아민-N,N'-디아세트산 부가생성물 수용액을 가하였다. 반응 혼합물을 64 내지 65°C 하에 추가로 12시간동안 가열한 다음 냉각시켰다. 반응 생성물의 일부를 농축시키고, 진공하에 메탄올을 제거하였다. 염산으로 용액을 pH 1.5 내지 2.0으로 조정하여 아세트산 생성물을 침전시켰다. 그 물질을 여과하고, 탈이온수로 세척하여, 진공 오븐에서 55 내지 60°C 하에 수시간동안 건조하였다. H NMR에 의해 구조를 확인하였다.

[실시예17]

N,N'-디(2-하이드록시-5-아미노벤질)에틸렌디아민-N,N'-디아세트산, 염산염의 제조(비교용)

실시예16에서 단리된 생성물 약 0.9g에 탈이온수 12.5g 및 진한 염산 8g을 가하였다. 그 용액을 환류하에 가열하고, 환저 반응 플라스크에서 1시간동안 교반하였다. 휘발물질을 제거하여(진공에서), 아민 염산염 생성물을 진공오븐에서 50 내지 60°C 하에 수시간동안 건조하였다. H NMR에 의해 구조를 확인하였다.

[실시예18]

에틸렌디아민디[(2-하이드록시-5-아세트아미도페닐)아세트산]의 제조(비교용)

수 냉각되는 환류 냉각기, 기계적 교반기 및 온도 조절기를 갖춘 온도계가 구비된 환저 반응 플라스크에 수성(50%) 글리옥실산(30.0g, 0.20몰), 98% 4-아세트아미도 페놀(30.9g, 0.20몰) 및 탈이온수(22g)를 가하였다. 빙-수욕으로 플라스크를 냉각하고, 온도를 30°C 미만으로 유지하면서, 50% 수산화나트륨 용액 19.0g을 교반하면서 서서히 가하였다. 30°C 미만의 온도에 에틸렌디아민(6.1g, 0.10몰)을 가하였다. 빙욕을 제거하고, 반응 혼합물을 85 내지 86°C 하에 가열 및 교반하였다. 에틸에테르 10g으로 수성반응 생성물 약 20g을 처리하였다. 에테르 층을 제거하고, 그 공정을 다시 반복하였다. 다음에, 염산을 사용

하여 수성부의 pH를 약 4.2로 조정한 다음, 아세톤 35g으로 교반하였다. 아세톤 층을 제거하여 폐기시켰다. 잔류 물질에 메탄올 65g을 교반하면서 가하였다. 생성된 고형물을 여과하고, 진공오븐에서 55 내지 60°C 하에 수시간동안 건조하였다.

[실시예19]

에틸렌디아민디[(2-하이드록시-5-아미노페닐)아세트산]의 제조(비교용)

상기 고형물 약 4.5g에 탈이온수 6g 및 진한 염산 21g을 가하였다. 혼합물을 여과하고, 물 6g을 가하였다. 수냉각되는 환류 냉각기, 기계적 교반기 및 온도계가 구비된 환지 반응 플라스크에 그 용액을 넣었다. 그 용액을 100 내지 103°C 하에 1시간동안 가열한 다음 냉각시켰다. 휘발물질을 진공에서 제거하고, 생성물, 에틸렌디아민디(2-하이드록시-5-아미노페닐)아세트산의 염산염을 진공오븐에서 60°C 하에 수시간동안 건조하였다. 아세틸 작용기를 가수분해한 후 H NMR에 의해 확인하였다.

[착물 제조 및 착물의 % 측정]

하기 실시예에서는 하기 용어를 사용하였다. 진한은 농축된 것을 의미하고; OAc는 아세테이트 잔기, OCOCH_3 를 의미하며; TLC는 박층 크로마토그래피를 의미하고; 주위온도는 실온 또는 약 20 내지 25°C를 의미하며; 밤새동안은 약 9내지 18시간을 의미하고; SP-세파덱스™ C-25 수지는 파마시아 인코포레이티드에서 시판하는, 설포산 작용기를 갖는 양이온 교환 수지이다.

몇가지 화합물의 이트륨 및/또는 사마륨 착물을 제조하여, 착물화 %를 하기와 같이 측정하였다.

[이트륨 착물 제조]

물중의 0.003M 이트륨 용액($\text{YCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 303.26g/몰; $\text{Y}(\text{OAc})_3$, 12.1% H_2O)을 제조함으로써 착물을 제조하였다. 방사성 YCl_3 (오크리지(Oakridge) 국립 실험실)을 가하여 원하는 수의 카운트(count)를 얻었다. Y 용액 990 μl 에 리간드 용액(0.03M) 10 μl 를 가하였다(리간드 대 금속비를 1:1로 하였다). (10:1의 리간드 대 금속비를 위해서는 리간드 용액의 양을 10배로 사용하였다). 다음에, μl 량의 염산 또는 수산화나트륨을 사용하여 pH를 7.4로 조정하였다. 다음으로, 하기에 주어진 양이온 교환법을 사용하여, 그 용액의 착물화된 이트륨의 양을 시험하였다.

[착물의 % 측정]

일회용 10ml의 플라스틱(바이오래드)(Biorad) 컬럼을 습윤 팽창된 세파덱스™ C-25 양이온 교환 수지 1 내지 2ml로 채웠다. 수지 상부로 물을 가압 용출시켰다. 수지 상부에 착염 15 μl (또는 카운트가 낮다면 그 이상)를 가하였다. 다음에, 계수관내로 적하하기 위한 용출제로서, 4:1의 (V:V) 등장성 염수:진한 수산화 암모늄 용액 2ml를 가하였다. 수지 상부로 이를 가압 용출시켰다. 추가의 용출제 2ml를 가하고, 모든 액체를 제거하기 위해 컬럼을 가압 용출시켰다. 다음으로 건조한 수지를 제3의 계수관에 넣고, 컴퓨터에 연결된 캔베라(Canberra) 다중채널 분석기를 사용하여 NaI 웰(well) 계수기상에서 세개의 관을 카운트하였다. 두 용출물에서의 카운트의 수를, 용출물과 칼럼 모두에서의 총 카운트로 나누어 100배 함으로써 착물의 %를 결정하였다. 이 방법에 의해, 착물화 되지 않은 이트륨은 컬럼상에 보유되었다.

[사마륨 착물 제조/착물의 % 측정]

0.1M 염산중에 Sm_2O_3 (348.7g/몰)을 용해시켜 0.0003M 사마륨을 제조하였음을 제외하고는 이트륨 착물에 대해 앞에서 기술한 바와 같이 사마륨 착물을 제조하였다. 미주리 대학 연구용 반응기(콜롬비아, 미주리)로부터 0.1M 염산중의 0.0003M 용액으로서의 방사성 Sm-153을 얻었다. 이트륨 착물의 경우와 동일한 방식으로 착물의 %를 측정하였다. 결과를 표 11에 요약하였다.

[표 2]

표 II

착물화 데이터

착물 실시예 번호	화합물의 실시예 번호	착물의 %(10:1)	
		Y	Sm
16	1	98	
17	2	>99	
18	2		>99
19	3	>99	
20	4	>99	
21	5	99	
22	6		>99
23	7		96**
24	8		>99**
25	9		>99
26	10	98	
27	11	99	
28	11	98*	
29	12	99	
30	12		98
31	12	98*	
32	12		98*
33	15	99	

* 리간드/금속 비는 약 1:1 이었다;
** 리간드/금속 비는 약 50:1 이었다.

[실시예 I-XV 및 비교실시예 A-F]

생체내에서의 이작용성 킬레이트의 검사

특정 희토류 킬레이트의 안정성은 동물의 생체내에서의 시험과 상호관련 있다. 예를 들면, 로소프 등의 논문[International Journal of Applied Radiation and Isotopes, 14, 129-135 (1963)]에는 특정 아미노 카복실산의 마우스에서의 방사성 희토류 금속 킬레이트의 분포에 대해 보고되어 있다. 생체내에서 희토류 이온에 대한 킬레이트제와 신체 구성체(무기 및 유기)사이의 경쟁이 그의 부착 및 배설을 결정한다는 상호관계가 알려져 있다. 강한 희토류 킬레이트는 거의 해리되지 않아 배설되는 반면, 약하거나 중간 강도의 킬레이트는 더 쉽게 해리되므로 간과 같은 기관에 부착되는 것으로 생각된다. 그러나, 간에서의 방사성 핵종의 농도는 항상 약한 착물 형성에 기인하지는 않고, 어떤 경우에는 금속 킬레이트가 간에 대해 갖는 친화성에 기인한다(표 III의 비교실시예 A 및 B 참조). 실제로, 간 기능을 평가하기 위한 화합물이 제조되어 사용되어 왔다(참조예: 프리츠버그, 알란 알.의 논문[Radiopharmaceuticals : Progress and Clinical Perspectives 1, (1986)]; (헌트 등의) 미합중국 특허 제4,088,747호 및 제4,091,088호).

본 명세서에 기술된 몇몇 사마륨 및/또는 이트륨 킬레이트의 생체 분포를 측정하고, 킬레이트의 안정성을 질적으로 평가하기 위한 생체내에서의 검사 공정으로서 간에서의 용량%를 사용하였다. 비교용으로 NTA 및 EDTA의 킬레이트가 포함되어 있다. 또한, 사마륨은 킬레이트화되지 않은 형태의 염화 사마륨으로 주사하였다.

찰스 리버(Charles River) 실험실로부터 150 내지 200g 중량의 스프라그-다우리 쥐(Sprague-Dawley Rat) 들을 구입하였다. 이들 동물을 우리에 넣고 물과 먹이를 무제한적으로 주었다. 이들 동물을 최소한 5일 동안 순화시킨 후 사용하였다. 착물을 주사하기 전에, 동물을 가열 램프하에(15 내지 30분) 두어 꼬리 정맥을 팽창시켰다. 다음에, 그 동물을 억제 우리에 넣고, 꼬리를 알콜로 닦아, 그 동물에게 꼬리 정맥을 통해 주사하였다(50 내지 200 μ l). 주사한 후, 동물을 2시간 동안 또다른 우리에 넣어둔 다음, 그 동물을 경부 절개하여 죽였다. 다음에, 그 동물을 해부하여, 탈이온수로 기관들을 수세하고, 적절하게 건조하여 칭량된 계수병내로 칭량을 부가하였다. 주사량이 어떻든지간에, 동일 물질로 된 최소한 세 개의 표준물질을 준비하고, 동물의 기관들을 사용하여 카운트하였다. 용량의 %는 기관에서의 카운트의 수를 표준물에서의 카운트의 수로 나누어 100배한 것이다(표 III 참조).

[표 3]

표 III

생체 분포 데이터

생물학 실시에 번호	화합물의 실시에 번호	금 속	간에 주사된 용량 %
I	1	Y	0.87
II	2	Y	0.22
III	3	Y	0.22
IV	4	Y	1.4
V	5	Y	0.38
VI	6	Sm	0.38
VII	9	Sm	2.8
VIII(10)	10	Sm	1.3
VIII(300)	10	Sm	0.12
VIII(10)	10	Y	0.39
VII(300)	10	Ho	0.27
IX	11	Y	0.22
X	11	Sm	0.33
XI	12	Y	0.28
XII	12	Y	0.18
XIII	12	Sm	0.35
XIV	12	Sm	0.26
XV	15	Y	0.37
(A)	U(비교)	Sm	12
(B)	X(비교)	Sm	24
(C)	EDTA	Sm	8.4
(D)	EDTA	Sm	4.4
(E)	NTA	Sm	8.6
(F)	SmCl ₃	Sm	39

* 리간드/금속 몰비를 실시에 I-XI, XIII, 및 XV의 경우에는 10:1, 실시에 XII 및 XIV의 경우에는 1:1, 실시에 C의 경우에는 5:1, 및 실시에 D 및 E의 경우에는 약 300:1로 하여 착물을 제조하였다.

[실시에XVI 및 XVII]

앞에서 기술한 기법을 사용하여, 1-(p-아미노벤질)디에틸렌트리아민펜타아세트산(ABDTPA), 문헌에 사용된 잘 알려진 이작용성 킬란트, 실시에2의 리간드(본 실시에XVI), 및 실시에12의 리간드(본 실시에XVII)와 이트륨의 1:1 착물을 제조하였다. 다음에 수백 μl 분량을 별도의 원심분리관에 넣었다. 총 부피의 변화를 최소화할 수 있도록 과량의 금속을 가하고 시간을 적었다. 금속 첨가후 반시간뒤에, 세파덱스 C-25 방법에 의해 착물의 %를 측정하고 이것을 착물의 원래의 양과 비교하였다. 가한 금속에 대한 착물의 %는 리간드-금속 착물의 불안정성에 대한 지표를 제공한다. 결과를 하기에 나타내었으며, EDTA-이트륨 착물과 비교하였다.

[표 4]

표 IV

착물 연구

금속/리간드 몰 비	착물 %			
	실시에 XVI	실시에 XVII	ABDTPA	EDTA
1	99	95	97	98
10	94	93	95	86
100	84	90	92	78
250	—	90	87	48
500	75	79	70	16

[실시에XVIII]

pH 6.5의 0.5M 아세트산 나트륨 완충용액중의 1-(p-아미노벤질)디에틸렌트리아민펜타아세트산(ABDTPA)의 0.18M/L 용액 및 실시예12의 리간드의 0.18M/L 용액을 제조하였다. 다음으로, 그 용액을 0.03M/L 염화이트륨으로서 이트륨-90 1.5당량으로 처리하였다. 생성된 착물의 pH는 5 내지 6이었다. 착물을 1ml 상(bed) 부피의 켈렉스 (Chelex) 수지를 통과시킴으로써 과잉의 Y-90을 제거하였다(바이오-래드(Bio-Rad) 실험실). 이 정제된 형태의 착물의 농도는 0.0013M 이었다. 이 용액의 적합한 양을, 1.7×10^{-9} 몰의 알데히드를 함유하는 CC-46 모노클론성 항체에 가하여, 40:1 비의 착물 대 항체를 제공하였다. 1시간동안 노출시킨 후, NaCNBH 236을 과량(항체에 비해)을 가하고, 그 용액을 약 1시간동안 유지하였다. 1시간 후, 세파덱스 G-25 겔 여과법에 의해 비결합된 착물로부터 항체(및 모든 공유 결합된 착물)를 분리하였다. 이 공정으로, 1-(p-아미노벤질)디에틸렌트리아민펜타아세트산의 경우에는 평균 5.0의 착물/항체, 실시예12의 리간드의 경우에는 평균 5.4의 착물/항체를 얻었다.

[실시에XIX]

실시에XVIII의 항체-착물 결합물의 불활성을 입증하기 위하여, 하기 방식으로 과량의 디에틸렌트리아민펜타아세트산(DTPA)를 사용하여 결합물을 처리하였다. pH 7.4의 HEPES 완충용액 (N-2-하이드록시에틸피레라진-N'-2-에탄설폰산)에 정제된 항체-착물을 가하고, 항체에 결합된 착물에 비해 1000배 몰 과량을 보충하기에 적합한 양의 0.1M DTPA 용액(pH 7.4)으로 처리하였다. 1시간 후에, 부분용액을 취하여, 겔 여과법을 사용하여 저 분자량 물질로부터 항체-착물 결합물을 분리하였다. 결과는 ABDTPA 계는 98% 이상의 이트륨을 손실한 반면 실시예12의 리간드를 사용한 계는 약 39%의 이트륨을 손실한 것으로 나타났다.

[실시에XX]

2,6-비스{[(2-[(비스(카복시메틸)]아미노)에틸)(카복시메틸)]아미노메틸}-4-(아미노)페놀, 사마륨 착물의 제조

1ml의 유리병에서, Sm(0.1M 염산중의 3×10^6 용액 200 μ l, 6x10밀리몰) 및 냉 SmCl \cdot 6H $_2$ O(4.8mg, 1.31×10^6 밀리몰)를 배합함으로써 사마륨 용액을 제조하였다. 이 용액을 실시예11의 공정에 의해 제조된 2,6-비스{[(2-[(비스(카복시메틸)]아미노)에틸)(카복시메틸)]아미노메틸}-4-(아세트아미도)페놀(3.2mg, 5.31×10^6 밀리몰)에 가하였다. 다음에, 수산화나트륨(1.0M 용액 40 μ l)을 가하여 pH를 7로 조정하였다. 세파덱스 C-25 방법을 사용한 결과, 착물의 %는 68%인 것으로 측정되었다.

상기 착물을 음이온 교환 크로마토그래피(Q-세파로즈, 1.5cmx21cm, 30분에 걸쳐 0 내지 1M NaCl, 2ml/분, 285nm에서 검출)에 의해 정제하였다. 착물-함유 분획물(각각 1ml, 총 6ml)을 합하였더니, 착물의 %가 95%로 측정되었다.

[실시에XXI]

CC-46 모노클론성 항체에 2,6-비스{[(2-[(비스(카복시메틸)]아미노)에틸)(카복시메틸)]아미노메틸}-4-(아미노)페놀, 사마륨 착물의 결합

1드램(dram)의 유리병에 중탄산나트륨(60mg, 7.14×10^6 밀리몰)을 넣고, 실시예XX의 착물 용액(1ml, 약 8.8×10^6 밀리몰)을 가하였다. 클로로포름(1ml)중의 티오포스겐(10 μ l, 1.31×10^6 밀리몰)을 가하고 그 병을 밀폐시켰다. 혼합물을 15분동안 흔든 후, 수성층을 클로로포름(1ml 분량)으로 2회 세척하였다. 착물의 %를 검사하였더니 96%로 나타났다.

상기 이소티오시아네이트 Sm 착물(100 μ l, 약 8.8×10^6 밀리몰)을 CC-46 모노 클론성 항체(8mg/ml 용액 100 μ l, 약 5.3×10^6 밀리몰)과 합하여 24시간 동안 정치 시켰다. 항체에 결합된 착물의 양은 크기 배제 크로마토그래피에 의해 46%로 측정되었다.

[실시예XXII]

2-[비스(2-[[비스(카복시메틸)]아미노]에틸)아미노]-2-[5-아미노-2-(카복시메틸옥시)페닐]에탄산, 및 2-[[2-[[2-[[비스(카복시메틸)]아미노]에틸](카복시메틸)아미노]에틸](카복시메틸)아미노]-2-[5-아미노-2-(카복시메틸옥시)페닐]에탄산, 사마륨 착물의 제조

실시예7의 동결건조된 고형물 266mg을 물 1ml에 용해시킴으로써 실시예7의 리간드의 용액을 제조하였다. 이 용액중의 33.85 μ l 분량을, 추적자량의 방사성 Sm 을 함유하는 0.1N 염산중의 3x10M SmCl 1ml로 처리하였다. 50중량% 수산화나트륨 용액으로 착물 용액의 pH를 약 13으로 조정한다음, 1.0N 염산을 사용하여 pH를 약 7.5로 조정하였다. 착물을 이론 Sm의 %를 실시예16 내지 33에 기술한 바와 같이 측정하였더니 100%로 나타났다.

별도의 2개의 유리병에 착물 용액 500 μ l 분량씩을 넣음으로써 착물의 불활성을 입증하였다. 하나의 분량을, pH가 낮아질 때까지 0.1N 염산 1 내지 2 μ l 분량으로 처리하고, 다른 하나의 분량을 pH가 올라갈 때까지 0.1N 수산화나트륨으로 처리하였다. 착물들을 각각의 변화된 pH에서 5 내지 10분동안 유지시킨 다음, 샘플을 채취하여 실시예16 내지 33에서 기술한 방법에 의해 그 pH에서의 착물화 %를 측정하였다. 하기 표에 그 결과를 나타내었다.

[표 5]

표 V

pH	착물화 %
1	98
2	100
3	100
4	100
5	100
7	100
9	100
11	100
13	100

[실시예XXIII]

2-[[2-[[2-[[비스(카복시메틸)]아미노]에틸](카복시메틸)아미노]에틸](카복시메틸)아미노]-2-[5-아미노-2-(카복시메틸옥시)페닐]에탄산, 사마륨 착물의 제조

실시예8의 갈색을 띤 고형물 13.9mg을 물 772 μ l에 용해시킴으로써 실시예8의 리간드의 용액을 제조하였다. 이 리간드 용액 500 μ l를, 방사성 Sm을 가한 3x10M SmCl (0.1N 염산함유) 1ml에 용해시킴으로써 착물을 제조하였다. 1.0N 수산화나트륨을 가하여 착물 용액의 pH를 약 7로 조정하였다. 실시예16 내지 33에 기술된 방법에 의해 착물화 %를 측정하였더니 96%로 나타났다.

별도의 2개의 유리병에 착물 용액 500 μ l 분량씩을 넣음으로써 착물의 불활성을 입증하였다. 하나의 분량을, pH가 낮아질 때까지 1.0N 염산 1 내지 2 μ l 분량으로 처리하고, 다른 하나의 분량을 pH가 올라갈 때까지 0.1N, 1.0N 및 50중량%의 수산화나트륨으로 처리하였다. 착물들을 각각의 변화된 pH에서 약 5분동안 유지시킨 다음, 샘플을 채취하여 실시예 16 내지 33에서 기술한 방법에 의해 그 pH에서의 착물화%를 측정하였다. 하기 표에 그결과를 나타내었다.

[표 6]

표 VI

pH	착물화 %
1	91
2	88
3	92
5	96
7	96
9	99
12	98
13	99

[생체 분포 데이터의 실시예]

리간드 및 금속의 용액을 혼합한 다음 pH를 7 내지 8로 조정함으로써 착물을 제조하였다. 양이온 교환 크로마토그래피에 의해 리간드와 착물을 이룬 금속의 양을 측정하였다. 수지에 의해 자유 금속은 보유되고, 착물 형태의 금속은 보유되지 않았다.

세마리의 스프래그 다우리 쥐의 꼬리정맥에 착물 용액 100 μ l를 주사하였다. 주사후 2시간이 지난 다음, 쥐를 경부 절개에 의해 죽이고, 조직의 샘플을 취했다, 조직을 칭량하고, Na I 웰 계수기를 사용하여 카운트의 수를 측정하고 표준물질과 비교함으로써 각 조직내의 방사물질의 양을 측정하였다. 혈액 중량은 동물 중량의 6.5%로 가정하여 혈액중의 용량%를 측정하였다.

신체 중량의 46%를 근육으로 계산하였다. 골에서의 양은 대퇴골에서의 용량%를 25배하였다. 하기 실시예는 사용된 리간드, 리간드의 양, 및 금속의 양이 다르다. 비-방사성 금속을 사용하여 목적하는 리간드 대 금속 비를 얻었고, 추적자 방사성 금속을 사용하여 생체분포를 얻었다.

[실시예XXIV]

실시예10의 리간드를 Sm-153 용액과 혼합하였다. Sm의 농도는 3x10M 이었고, 리간드는 300배 몰과량으로 사용하였다. 생체분포는 골에서 52.7%, 간에서 0.12%, 비장에서 0.005%, 근육에서 0.23%, 및 혈액에서 0.05%로 나타났다.

[실시예XXV]

실시예10의 리간드를 Ho-166에 착물화 하였다. Ho의 농도는 3x10M 이었고, 제제는 300배 몰과량의 리간드를 함유하였다. 생체분포는 골에서 52.9%, 간에서 0.26%, 비장에서 0.007%, 근육에서 1.1%, 및 혈액에서 0.09%로 나타났다.

[실시예XXVI]

3x10M 농도의 Sm 및 10배 몰 과량의 리간드를 사용하여, 실시예 10의 리간드를 Sm-153에 착물화하였다. 생체 분포는 골에서 48.5%, 간에서 1.3%, 비장에서 0.01%, 근육에서 0.73%, 및 혈액에서 0.18%로 나타났다.

[실시예XXVII]

3x10M 의 Y를 가진 Y-90 및 10배 몰 과량의 실시예 10의 리간드를 갖는 제제를 사용하여, 쥐와 동일한 방법으로 토끼에게 주사하였다. 활성은, 간(1.1%), 비장(0.19%), 근육(.15%) 및 혈액(.068)은 최소의 흡수를 보이면서 골(59%)에 집중된 것으로 나타났다.

[실시예XXVIII]

추적자로서 Y-90을 사용하여 실시예1의 리간드를 착물화하였다.

Y의 농도는 3x10M 이었고 리간드는 10배 몰 과량으로 가해졌다. 쥐의 생존분포(두마리의 쥐의 평균)는 골에서 56.1%, 간에서 0.87%, 비장에서 0.03%, 근육에서 0.78%, 및 혈액에서 0.57%로 나타났다.

[실시예XXIX]

우측 기부의 상완골에 골육종이 있어 상당히 절름거리며 걷는 개를 제공하였다. Sm-153 용액과 함께 실시예10의 리간드를 사용하여 착물을 제조하였다. Sm의 농도는 3x10M 이었고, 리간드는 300배 몰 과량으로 사용하였다. Sm-153의 비활성도는 30 mCi/ml 었다. 개에게 그 개의 체중 1kg 당 Sm-153 0.95mCi 를 함유하는 이 착물을 정맥내 주사하였다. 주사한지 일주일후 그 개의 보행은 훨씬 나아졌다.

[표 1a]

표 I: 일반구조

(I)

실시예 번호	Z	X	R ₅	n	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	B
1	-NHCOCH ₃	-H	-H	0	-	-	-H	-COOH	
2	-NHCOCH ₃	CH ₂ COOH	-H	0	-	-	-H	-COOH	
3	-NH ₂	CH ₂ COOH	-H	0	-	-	-H	-COOH	
4	-NHCOCH ₃	-H	-H	0	-	-	-H	-COOH	

[표 1b]

실시예 번호	Z	X	R ₅	n	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	B
5	-NH ₂	-H	H	0	-	-	-H	-COOH	
6	-NHCOCH ₃	CH ₂ CO ₂ H	H	0	-	-	-H	-COOH	 +

[표 1c]

실시예 번호	Z	X	R ₅	n	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	B
7	-NH ₂	CH ₂ COOH	H	0	-	-	-H	-COOH	
8	-NH ₂	CH ₂ COOH	H	0	-	-	-H	-COOH	

[표 1d]

실시예 번호	Z	X	R ₅	n	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	B
9	-NHCOCH ₃	CH ₂ CO ₂ H	-H	0	-	-	-H	-COOH	
10	-NHCOCH ₃	-H		0	-	-	-H	-COOH	

[표 1e]

실시예 번호	Z	X	R ₅	n	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	B
11	-NHCOCH ₃	-H		0	-	-	-H	-H	
12	-NH ₂	-H		0	-	-	-H	-H	
13	-NCS	-H		0	-	-	-H	-H	

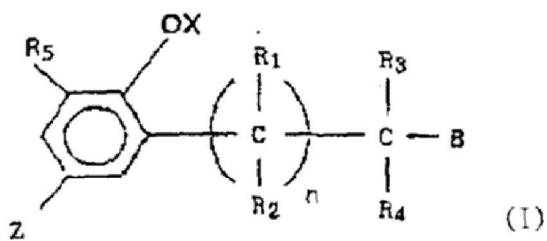
[표 1f]

실시예 번호	Z	X	R ₅	n	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	B
14	-NHCOCH ₃	-H	-H	0	-	-	-H	-H	
15	-NHCOCH ₃	-H		0	-	-	-H	-H	

(57) 청구의 범위

청구항 1

오르토 결합 작용기를 갖는 하기 일반식(1)의 이작용성 킬란트 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염:



상기식에서, Z는 아미노, 이소티오시아네이토, 세미카바자이드, 티오세미카바자이드, 브로모아세트아미도 또는 말레이미도이고; X는 수소, C₁ 내지 C₃ 알킬 또는 CR₃R₄CO₂H이며; R₁, R₂, R₃ 및 R₄는 각각 독립적으로 수소, 하이드록시, CO₂H 또는 C₁ 내지 C₃ 알킬 그룹이고, 이때 단 n이 0이고 R₅가 수소일 때 R₃와 R₄ 중 어느 하나는 CO₂H임을 조건으로 하며; R₅는 수소 또는 (CR₁R₂)_nCR₃R₄B 이며; B는 아민 수소중 하나가 CR₃R₄CO₂H 그룹으로 치환된 선형 또는 분지형 아민, 또는 폴리알킬렌 아민을 나타내고; n은 0 또는 1이다.

청구항 2

제1항에 있어서, n이 0인 이작용성 킬란트.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, R₄가 CO₂H인 이작용성 킬란트.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, X가 수소인 이작용성 킬란트.

청구항 5

제1항에 있어서, R₁, R₂ 및 R₃가 각각 수소인 이작용성 킬란트.

청구항 6

제1항에 있어서, 2-[(2-{비스(카복시메틸)아미노}에틸)아미노]-2-(5-아세트아미도-2-하이드록시페닐)-에탄산인 이작용성 킬란트.

청구항 7

제1항에 있어서, 2-[(2-{비스(카복시메틸)아미노}에틸)(카복시메틸)아미노]-2-[5-아세트아미도-2-(카복시메틸옥시)페닐]-에탄산인 이작용성 킬란트.

청구항 8

제1항에 있어서, 2-[(2-{비스(카복시메틸)아미노}에틸)(카복시메틸)아미노]-2-[5-아미노-2-(카복시메틸옥시)페닐]-에탄산인 이작용성 킬란트.

청구항 9

제1항에 있어서, 2-[(2-{비스(카복시메틸)아미노}에틸)(시아노메틸)아미노]-2-[5-아세트아미도-2-(하이드록시페닐)에탄산인 이작용성 킬란트.

청구항 10

제1항에 있어서, 2-[(2-{비스(카복시메틸)아미노}에틸)(카복시메틸)아미노]-2-(5-아미노-2-하이드록시페닐)-에탄산인 이작용성 킬란트.

청구항 11

제1항에 있어서, 2-비스(2-{비스(카복시메틸)아미노}에틸)아미노]-2-[5-아세트아미도-2-(카복시메틸옥시)페닐]에탄산인 이작용성 킬란트.

청구항 12

제1항에 있어서, 2-[[2-2-{비스(카복시메틸)아미노}에틸)(카복시메틸)아미노]에틸(카복시메틸)아미노]-2-[5-아세트아미도-2-(카복시메틸옥시)페닐]에탄산인 이작용성 킬란트.

청구항 13

제1항에 있어서, 2-[(2-[(2-[(2-{비스(카복시메틸)아미노}에틸)(카복시메틸)아미노]에틸)(카복시메틸)아미노]에틸)(카복시메틸)아미노]-2-[5-아세트아미도-2-(카복시메틸옥시)페닐]에탄산인 이작용성 킬란트.

청구항 14

제1항에 있어서, 2-[(2-[(2-[(2-{비스(카복시메틸)아미노}에틸)(카복시메틸)아미노]에틸)(2-{비스(카복시메틸)아미노}에틸)아미노]-2-[5-아세트아미도-2-(카복시메틸옥시)페닐]에탄산인 이작용성 킬란트.

청구항 15

제1항에 있어서, 2,6-비스{비스(카복시메틸)아미노}메틸}-4-(아세트아미도)페놀인 이작용성 킬란트.

청구항 16

제1항에 있어서, 2,6-비스{2-[(2-{비스(카복시메틸)아미노}에틸)(카복시메틸)아미노]메틸}-4-(아세트아미도)페놀인 이작용성 킬란트.

청구항 17

제1항에 있어서, 2,6-비스{[(2-{[비스(카복시메틸)]아미노}에틸)(카복시메틸)]아미노메틸}-4-(아미노)페놀인 이작용성 킬란트.

청구항 18

제1항에 있어서, 2,6-비스{[(2-{[비스(카복시메틸)]아미노}에틸)(카복시메틸)]아미노메틸}-4-(이소티오시아네이트)페놀인 이작용성 킬란트.

청구항 19

제1항에 있어서, 2-({[비스(카복시메틸)]아미노}에틸)-6-({[비스(카복시메틸)]아미노}에틸)(카복시메틸)아미노메틸}-4-(아세트아미도)페놀인 이작용성 킬란트.

청구항 20

La, Ce, Pr, Nd, Pm, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, Lu, Y 또는 Sc 중에서 선택된 금속 이온과 착물을 이룬, 제1항 또는 제2항에서 청구한 킬란트 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염을 포함하는 착물.

청구항 21

제20항에 있어서, 금속 이온이 ^{153}Sm , ^{166}Ho , ^{90}Y , ^{149}Pm , ^{159}Gd , ^{140}La , ^{177}Lu , ^{175}Yb , ^{47}Sc 또는 ^{142}Pr 인 착물.

청구항 22

항체 또는 항체 단편에 공유 결합된, 제20항 또는 제21항에서 청구한 착물을 포함하는 결합물.

청구항 23

제22항에 있어서, 항체 또는 그의 단편이 모노클론성 항체 또는 그의 단편인 결합물.

청구항 24

제23항에 있어서, 항체 또는 그의 단편이 CC-46, CC-49, CC-49 F(ab')₂, CC-83, CC-83 F(ab')₂ 또는 B 72.3 인 결합물.

청구항 25

제20항 또는 제21항에서 청구한 착물, 및 생리학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 암 치료용 약제학적 제제.

청구항 26

제22항에서 청구한 결합물, 및 생리학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 암 치료용 약제학적 제제.

청구항 27

제20항 또는 제21항에서 청구한 착물, 및 생리학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 골 통증 치료용 약제학적 제제.

청구항 28

제22항에서 청구한 결합물, 및 생리학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 골 통증 치료용 약제학적 제제.