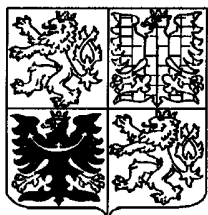


ČESKÁ
REPUBLIKA

(19)



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(12)

(22) 05.05.94

(32) 06.05.93

(31) 93/057588

(33) US

(40) 15.01.97

(21) 2895-95

(13) A3

6(51)

A 61 K 31/44

A 61 K 31/675

C 07 D 401/06

C 07 F 9/30

C 07 F 9/38

C 07 F 9/40

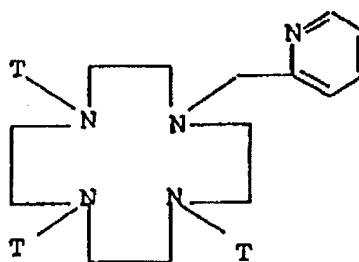
// G 01 N 24/08

(71) THE DOW CHEMICAL COMPANY, Midland, MI, US;

(72) Kiefer Garry E., Lake Jackson, TX, US;
Kim Won D., Richardson, TX, US;

(54) **2-Pyridylmethylenpolyazamacrocyclické
sloučeniny, způsob jejich výroby, jejich
komplexy, farmaceutické prostředky a způsob
diagnostikace**

(57) 2-pyridylmethylenpolyazamacrocyclické sloučeniny obecného vzorce I, kde T nezávisle představuje skupinu vzorce $-\text{CH}_2\text{COOH}$, $-\text{CH}_2\text{P}(\text{O})\text{ROH}$ nebo vzorce A, kde R představuje hydroxyskupinu, alkylskupinu s 1 až 5 atomy uhlíku nebo alkoxy skupinu s 1 až 5 atomy uhlíku; R^1 představuje hydroxyskupinu nebo methoxyskupinu a R^2 představuje nitroskupinu, aminoskupinu, isothiokyanatoskupinu, semikarbazidoskupinu, thiosemikarbazidoskupinu, maleinimidoskupinu, bromacetamidokupinu nebo karboxyskupinu; přičemž pouze jeden ze zbytků T představuje skupinu obecného vzorce A, kde R^1 a R^2 mají výše uvedený význam a přičemž alespoň jeden ze symbolů T představuje skupinu vzorce $-\text{CH}_2\text{P}(\text{O})\text{ROH}$, kde R představuje alkoxy skupinu s 1 až 5 atomy uhlíku; a jejich farmaceuticky vhodné soli. Tyto sloučeniny mohou tvořit inertní komplexy s ionty gadolinia, manganu nebo železa, přičemž celkový náboj komplexu lze měnit za účelem modifikace biolokalizace in vivo. Tyto komplexy jsou užitečné jako kontrastní činidla diagnostickaci zobrazováním magnetickou resonancí. Řešení se týká také způsobu výroby těchto sloučenin a farmaceutických prostředků na bázi výše uvedených komplexů.



(I)

č.j.	021715
DOŠLO	22. III. 96
URAD	PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ
PŘÍL.	

2-Pyridylmethylenpolyazamakrocyclické sloučeniny, způsob jejich výroby, jejich komplexy, farmaceutické prostředky a způsob diagnostikace

Oblast techniky

Vynález se týká ligandů, kterými jsou 2-pyridylmethylenpolyazamakrocyclofosfonové kyseliny, jejich komplexy a deriváty pro použití jako kontrastních činidel při zobrazování magnetickou rezonancí (MRI). Vynález se týká také způsobu výroby těchto ligandů, farmaceutických prostředků na bázi výše uvedených komplexů a způsobu diagnostikace za použití těchto prostředků.

Dosavadní stav techniky

MRI je neinvasivní diagnostická technika, kterou lze získat dobře rozlišitelné příčné obrazy měkkých tkání živočišného těla, přednostně lidského těla. Tato technika je založena na vlastnosti určitých atomových jader (například protonů vody) vykazujících magnetický moment [definovaný matematickými rovnicemi; viz G. M. Barrow, Physical Chemistry, 3. vydání, McGraw-Hill, New York (1973)], která spočívá v tom, že se tato jádra uspořádají v aplikovaném magnetickém poli. Po dosažení tohoto uspořádání je možno vzniklý rovnovážný stav porušit aplikací vnějšího vysokofrekvenčního (radiofrekvenčního, RF) pulsu, který způsobí, že se protony odchýlí z uspořádání v magnetickém poli. Po ukončení vysokofrekvenčního pulsu se jádra vrátí do svého rovnovážného stavu a doba, které je zapotřebí pro tento návrat je známa jako relaxační doba. Tato relaxační doba se skládá ze dvou parametrů, tj. relaxační doby spin-mřížka (T1) a relaxační doby spin-spin (T2). Měření těchto relaxač-

ních parametrů poskytuje informaci o stupni molekulární organizace a interakce protonů s obklopujícím prostředím.

Jelikož živá tkáň obsahuje značný podíl vody a mezi různými typy tkání existují odchylky v obsahu vody a odchylky v prostředí, je možno tímto způsobem získat diagnostické obrazy biologických organismů, které reflektují hustotu protonů a relaxační doby. Čím větší jsou rozdíly v relaxačních dobách (T_1 a T_2) protonů přítomných ve zkoumané tkáni, tím bude mít získaný obraz vyšší kontrast (viz například J. Magnetic Resonance 33, 83 až 106 (1979)).

Je známo, že paramagnetické cheláty vykazující symetrický elektronový základní stav, mohou dramaticky ovlivnit relaxační dobu T_1 a T_2 k nim přilehlých protonů vody a že účinnost těchto chelátů je v tomto ohledu zčásti podmíněna počtem nepárových elektronů vytvářejících magnetický moment (viz například Magnetic Resonance Annual, 231 až 266, Raven Press, NY (1985)). Také bylo demonstrováno, že když se paramagnetický chelát tohoto typu podá živému živočichovi, je možno jeho vliv na relaxační dobu T_1 a T_2 v různých tkáních přímo pozorovat v obrazech získaných magneticou resonancí (MR), přičemž v oblastech umístění chelátu je pozorováno zvýšení kontrastu. Proto bylo navrženo podávat stále netoxické paramagnetické cheláty živočichům na účelem zvýšení diagnostické informace získané technikou MRI [viz například Frontiers of Biol. Energetics I, 752 až 759 (1978); J. Nucl. Med. 25, 506 až 513 (1984); Proc. of NMR Imaging Symp. (26. až 27. října 1980); F. A. Cotton et al., Adv. Inorg. Chem. 634 - 639 (1966)]. Paramagnetické kovové cheláty používané tímto způsobem jsou označovány jako činidla zvyšující kontrast nebo jednoduše jako kontrastní činidla.

Existuje řada paramagnetických kovových iontů, které je možno brát v úvahu, má-li se vyvinout kontrastní

činidlo pro MRI. V praxi jsou však nejužitečnějšími paramagnetickými kovovými ionty ion gadolinia (Gd^{3+}), železa (Fe^{3+}), manganu (Mn^{2+} a Mn^{3+}) a chromu (Cr^{3+}), poněvadž tyto ionty vykazují největší vliv na protony vody z toho důvodu, že mají vysoký magnetický moment. V nekomplexní formě jsou tyto kovové ionty (například chlorid gadolinitý) vůči živočichům toxické, což znemožňuje jejich použití ve formě jednoduchých solí. Základní úlohou organického chelatačního činidla (které je zde také označováno názvem "ligand") je učinit paramagnetický kov netoxickým vůči živočichům při zachování jeho požadovaného vlivu na relaxační dobu T_1 a T_2 obklopujících protonů vody.

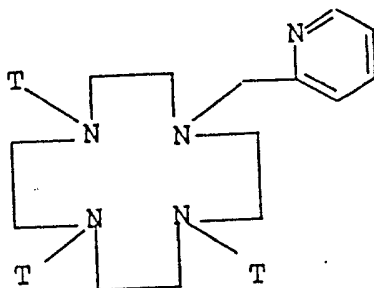
Dosavadní stav techniky v oboru MRI je poměrně rozsáhlý, takže následující souhrn nelze chápat jako vyčerpávající a jeho účelem je pouze poskytnout přehled této oblasti a upozornit i na jiné sloučeniny, které by mohly mít podobnou strukturu. V US patentu č. 4 899 755 je popsán způsob ovlivňování relaxačních dob při protonové nukleární magnetické resonanci jater nebo žlučovodu živočicha za použití komplexů Fe^{3+} -ethylen-bis(2-hydroxyfenylglycin) a jejich derivátů a kromě jiných sloučenin je zde navrhováno možné použití pyridinmakrocyclomethylenkarboxylové kyseliny. V US patentu č. 4 880 008 (patent typu CIP vzhledem k US patentu č. 4 899 755) jsou popsána přídatná zobrazovací data pro tkáň krysích jater, ale nejsou zde uvedeny žádné další komplexy. V US patentu č. 4 980 148 jsou popsány komplexy gadolinia pro MRI, které nemají povahu cyklických sloučenin. V publikaci C. J. Broan et al., J. Chem. Soc., Chem. Commun., 1739 až 1741 (1990) jsou popsány některé bifunkční makrocyclické fosfinové kyseliny. V publikaci C. J. Broan et al., J. Chem. Soc., Chem. Commun., 1738 až 1739 (1990) jsou popsány určité triazabicyklosloučeniny. V publikaci I. K. Adzamlı et al., J. Med. Chem. 32, 139 až 144 (1989) jsou

popsány acyklické fosfonátové deriváty komplexů gadolinia pro zobrazování NMR.

V současné době jsou jako jediná obchodně dostupná kontrastní činidla v USA k dispozici komplexy gadolinia s diethylentriaminpentaoctovou kyselinou (DTPA-Gd⁺³ - Magnevist^(R)), výrobek firmy Shering a DO3A derivát [1,4,7-tris(karboxymethyl)-10-(2-hydroxypropyl)-1,4,7,10-tetraazacyklododekanato]gadolinia (Prohance^(R)), výrobek firmy Squibb). Jak Magnevist^(R), tak Prohance^(R) jsou považovány za nespecifická perfusní činidla, poněvadž se volně rozdělují v extracelulární kapalině a účinně se eliminují prostřednictvím renálního systému. Magnevist^(R) se ukázal být vysoce cenným při diagnóze mozkových lézí, poněvadž doprovázející zhroucení bariéry mezi krví a mozkiem umožňuje perfusi kontrastního činidla do postižených oblastí. Kromě Magnevistu^(R) je na trhu k dostání makrocyclické perfusní činidlo Guerbet, tj. [1,4,7,10-tetrakis(karboxymethyl)-1,4,7,10-tetraazacyklododekanato]gadolinium (Dotarem^(R)), kteréžto činidlo je v současné době dostupné pouze v Evropě. Prohance^(R) má méně vedlejších účinků než Magnevist^(R). Řada dalších potenciálních kontrastních činidel se nalézá v různých stádiích vývoje.

Podstata vynálezu

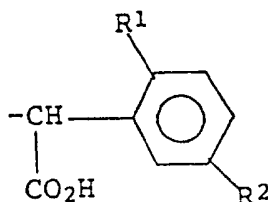
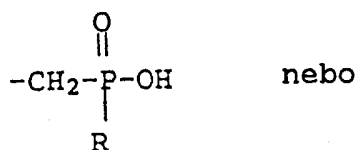
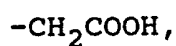
Předmětem vynálezu jsou nové ligandy, kterými jsou 2-pyridylmetylenpolyazamacrocyclické sloučeniny a jejich deriváty obecného vzorce I



(I)

kde

T nezávisle představuje skupinu vzorce



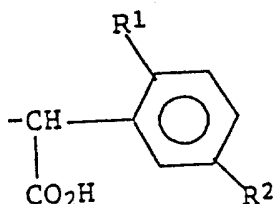
kde

R představuje hydroxyskupinu, alkylskupinu s 1 až 5 atomy uhlíku nebo alkoxykupinu s 1 až 5 atomy uhlíku;

R¹ představuje hydroxyskupinu nebo methoxyskupinu a

R² představuje nitroskupinu, aminoskupinu, isothio-
kyanatoskupinu, semikarbazidoskupinu, thiosemikar-
bazidoskupinu, maleinimidoskupinu, bromacetamido-
skupinu nebo karboxyskupinu;

příčemž pouze jeden ze zbytků T představuje skupinu obecné-
ho vzorce



kde R¹ a R² mají výše uvedený význam;

a jejich farmaceuticky vhodné soli.

Pokud ve výše uvedených ligandech obecného vzorce I znamenají všechny symboly T skupinu vzorce $-\text{CH}_2-\text{P}(\text{O})\text{ROH}$, kde R představuje hydroxyskupinu, nebo pokud se jedná o farmaceuticky vhodné soli těchto sloučenin, jsou tyto ligandy v tomto popisu označovány názvem PD3P.

Pokud ve výše uvedených ligandech obecného vzorce I znamenají všechny symboly T skupiny $-\text{CH}_2-\text{COOH}$, nebo pokud se jedná o farmaceuticky vhodné soli těchto sloučenin, jsou tyto ligandy v tomto popisu označovány názvem PD3A.

Pokud ve výše uvedených ligandech obecného vzorce I znamenají všechny symboly T skupinu vzorce $-\text{CH}_2-\text{P}(\text{O})\text{ROH}$, kde R představuje alkoxyskupinu s 1 až 5 atomy uhlíku, nebo pokud se jedná o farmaceuticky vhodné soli těchto sloučenin, jsou tyto ligandy v tomto popisu označovány názvem PD3(O-Alk)P.

Pokud ve výše uvedených ligandech obecného vzorce I znamenají všechny symboly T skupinu vzorce $-\text{CH}_2-\text{P}(\text{O})\text{ROH}$, kde R představuje alkylskupinu s 1 až 5 atomy uhlíku, nebo pokud se jedná o farmaceuticky vhodné soli těchto sloučenin, jsou tyto ligandy v tomto popisu označovány názvem PD3(Alk)P.

Komplexy podle tohoto vynálezu je možno navrhnout tak, aby zajišťovaly specifický celkový náboj, který výhodně ovlivňuje biolokalizaci in vivo a kontrast obrazu. Tak například pokud má kovový ion náboj 3+, je možno získat následující činidla:

činidla s celkovým nábojem 3-, pokud je sloučeninou obecného vzorce I PD3P; tato činidla jsou užitečná jako kontrastní činidla kalcifikovaných tkání;

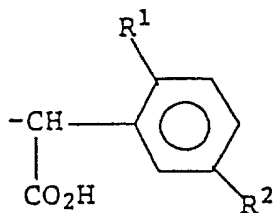
čínidla s celkovým nábojem 2-, pokud sloučenina obecného vzorce I obsahuje dvě skupiny T představující skupiny vzorce $-\text{CH}_2-\text{PO}_3\text{H}_2$ a jednu skupinu T, která obsahuje karboxyskupinu; tato čínidla jsou užitečná jako kontrastní čínidla kalcifikovaných tkání;

čínidla s celkovým nábojem 1-, pokud sloučenina obecného vzorce I obsahuje jednu skupinu T představující skupinu vzorce $-\text{CH}_2-\text{PO}_3\text{H}_2$ a ostatní skupiny T obsahují karboxyskupiny; tato čínidla jsou užitečná jako kontrastní čínidla kalcifikovaných tkání;

čínidla s celkovým nábojem 0, pokud sloučenina obecného vzorce I obsahuje jednu skupinu T představující skupinu vzorce $-\text{CH}_2-\text{PO}_3\text{HR}$, kde R představuje alkoxykupinu s 1 až 5 atomy uhlíku nebo alkylskupinu s 1 až 5 atomy uhlíku a zbývající dvě skupiny T obsahují karboxyskupiny; nebo pokud sloučenina obecného vzorce I obsahuje jako všechny tři skupiny T skupiny vzorce $-\text{CH}_2\text{PO}_3\text{HR}$, kde R představuje alkoxykupinu s 1 až 5 atomy uhlíku nebo alkylskupinu s 1 až 5 atomy uhlíku; nebo pokud sloučenina obecného vzorce I obsahuje jako všechny tři skupiny T skupiny vzorce $-\text{CH}_2-\text{COOH}$ (PD3A); tato čínidla jsou užitečná jako kontrastní čínidla pro obecnou perfusi, krev, mozek nebo játra. kalcifikovaných tkání.

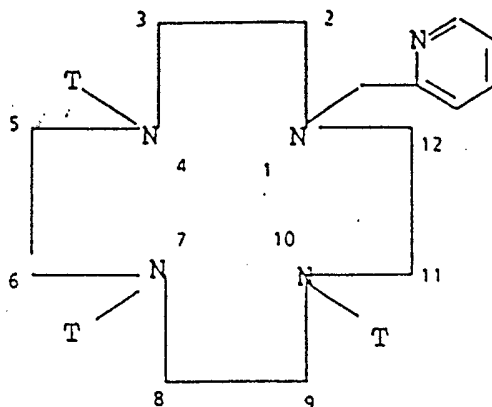
Tyto komplexy je možno zpracovávat na farmaceuticky vhodné prostředky, které se hodí pro podávání živočichům.

Pokud má jedna skupina T strukturu odpovídající obecnému vzorci



kde R^1 a R^2 mají výše uvedený význam, potom je tato sloučenina bifunkčním ligandem/komplexem a může být připojena prostřednictvím zbytku R^2 k biologicky účinné molekule.

Pro názvoslovné účely jsou sloučeniny obecného vzorce I číslovány následujícím způsobem



Jedním aspektem tohoto vynálezu je vývoj kontrastních činidel vykazujících syntetické modifikace paramagnetického chelátu umožňující místně orientovanou dodávku kontrastního činidla do požadované tkáně. Výhodou je přitom zvýšení kontrastu v oblastech zájmu (na základě afinity tkáně) ve srovnání s kontrastem, k němuž dochází při nespecifické perfusi, který může, ale nemusí být zřejmý za použití extracelulárního činidla. Specificitu ligandu obecného vzorce I je možno regulovat přizpůsobením celkového náboje a lipofilního charakteru tohoto komplexu. Rozmezí celkového náboje komplexu je od -3 do 0, jak to bylo uvedené výše. Tak například v případě komplexu obsahujícího tři skupiny vzorce PO_3H_2 (PD3P) je celkový náboj vysoce negativní a lze očekávat příjem v kostech, zatímco když je celkový náboj komplexu nulový, (tj. jedná se o neutrální ligand PD3A, PD3(O-Alk)P nebo PD3(Alk)P), může mít komplex schopnost překročit bariéru mezi krví a mozkiem a může být umožněn normální příjem v mozku. Komplex s celkovým nábojem 0 [PD3(O-Pr)P] je s překvapením přijímán v játrech.

Aniž by se původci chtěli vázat na platnost nebo neplatnost nějaké teorie předpokládají, že když se zhotoví nabitý komplex podle vynálezu (například s nábojem 3- pro kosti, 1- pro játra nebo 1+ pro srdce), mohou změny iontového náboje chelátu ovlivnit biolokalizaci.

Tkáňové specifacity se také může dosáhnout iontovým nebo kovalentním připojením chelátu k přírodní nebo syntetické molekule (například prostřednictvím zbytku R^2), která vykazuje specifacitu pro požadovanou cílovou tkáň. Jediná možná aplikace tohoto přístupu spočívá v použití chelátem konjugovaných monoklonálních protilátek, které dopravují paramagnetický chelát do chorobné tkáně, což umožňuje její vizualizaci technikou MRI. Kromě toho, připojení paramagnetického chelátu k makromolekule může dále zvýšit účinnost kontrastního činidla projevující se zlepšeným kontrastem vzhledem k použití nevázaného chelátu. Nedávná Laufferova práce (patenty USA č. 4 880 008 a 4 899 755) ukázala, že změny v lipofilitě mohou mít za následek vznik tkáňově specifických činidel a že zvýšený lipofilní charakter favorizuje nekovalentní interakce s krevními proteiny spojené se zvýšením relaxivity.

Typické deriváty D03A, v nichž jsou přítomny nekoordinální N-substituenty, vytvářejí neutrální lanthanidové cheláty, ale zjistilo se, že jsou kineticky labilní za kyselých podmínek. Derivát D03A Prohance^(R) vykazuje kinetickou stabilitu, která je mu dodána pendantní hydroxyskupinou, která je schopna koordinace s kovovým iontem. Tato pendantní hydroxyskupina však může pozměnit celkový iontový charakter chelátu.

Naproti tomu tento vynález se týká skupiny derivátů D03A obecného vzorce I, které obsahují 2-pyridylovou pendantní skupinu, která vytváří koordinační vazbu, aniž by

měníla celkový iontový charakter chelátu. Kromě toho se zjistilo, že tento 2-pyridylový substituent zvyšuje kinetickou stabilitu chelátu za kyselých podmínek (tj. při hodnotách pH nižších než asi 7). U chelátů podle vynálezu obsahujících jako ligační zbytky skupiny PO_3HR , kde R představuje alkokyskupinu s 1 až 5 atomy uhlíku, byl zjištěn potenciál zobrazovacích činidel pro játra.

Následují definice pojmů používaných v legendě k obecnému vzorci I a v jiných částech popisu tohoto vynálezu:

Pod označením "alkylskupina s 1 až 5 atomy uhlíku" a "alkoxyskupina s 1 až 5 atomy uhlíku" se rozumějí příslušné skupiny s přímým nebo rozvětveným řetězcem.

Pod označením "živočich" se rozumí teplokrevný savec, přednostně člověk.

Pod označením "komplex" se rozumí komplex sloučeniny podle vynálezu, například sloučeniny obecného vzorce I, vytvořený s kovovým iontem, přičemž v tomto komplexu je chelatován nebo sekvestrován alespoň jeden kovový atom.

Pod označením "biologicky účinná látka" se zde rozumí dextran, peptid nebo molekula vykazující specifickou afinitu vůči receptoru nebo přednostně protilátka nebo její fragment.

Pod označením "protilátka" se rozumí jakákoliv polyklonální, monoklonální nebo chimerická protilátka nebo heteroprotilátka, přednostně monoklonální protilátka. Pod označením "fragment protilátky" se rozumí fragment Fab a fragment $F(ab')_2$ a jakákoliv část protilátky vykazující specifitu vůči požadovanému epitopu nebo epitopům. Pokud

se používá termínu "konjugát chelátu radioaktivního kovu a protilátky" nebo termínu "konjugát", rozumí se pod označením "protilátka" celá protilátka a/nebo její fragmenty, včetně polosyntetických variant nebo variant získaných metodami genového inženýrství. Jako možné protilátky je možno uvést 1116-NS-19-9 (protilátka vůči kolorektálnímu karcinomu), 1116-NS-3d (anti-CEA), 703D4 (protilátka vůči humánní plicní rakovině), 704A1 (protilátka vůči humánní plicní rakovině), CC49, CC83 a B72.3. Hybridomální buněčné linie 1116-NS-19-9, 1116-NS-3d, 703D4, 704A1, CC49, CC83 a B72.3 jsou uloženy ve sbírce American Type Culture Collection pod přírůstkovými čísly ATCC HB 8059, ATCC CRL 8019, ATCC HB 8301, ATCC HB 8302, ATCC HB 9459, ATCC HB 9453 a ATCC HB 8103.

Bifunkčních chelatačních činidel, která jsou popsána v tomto textu, (obecného vzorce I) je možno použít pro chelataci nebo sekvestraci kovových iontů za vzniku chelatovaných kovových iontů, které jsou zde označovány také názvem "komplexy". Tyto komplexy mohou být díky přítomnosti funkcionalizačního zbytku [kterým je zbytek R^2 v obecném vzorci I] kovalentně připojeny k biologicky účinným látkám, jakoo jsou dextransy, molekuly vykazující specifickou afinitu vůči receptorům a přednostně jsou kovalentně připojeny k protilátkám nebo jejich fragmentům. Komplexy podle vynálezu, které jsou kovalentně připojeny k protilátkám nebo jejich fragmentům nebo které vykazují specifickou afinitu vůči receptorům, jsou zde označovány názvem "konjugáty".

Pod označením "farmaceuticky vhodné soli" se zde rozumějí soli nebo směsi solí sloučenin obecného vzorce I, které jsou dostatečně netoxické, aby byly užitečné při diagnostice živočichů, včetně člověka. Jako reprezentativní příklady solí, které jsou vhodné podle vynálezu, je možno uvést soli organického a anorganického původu, jako

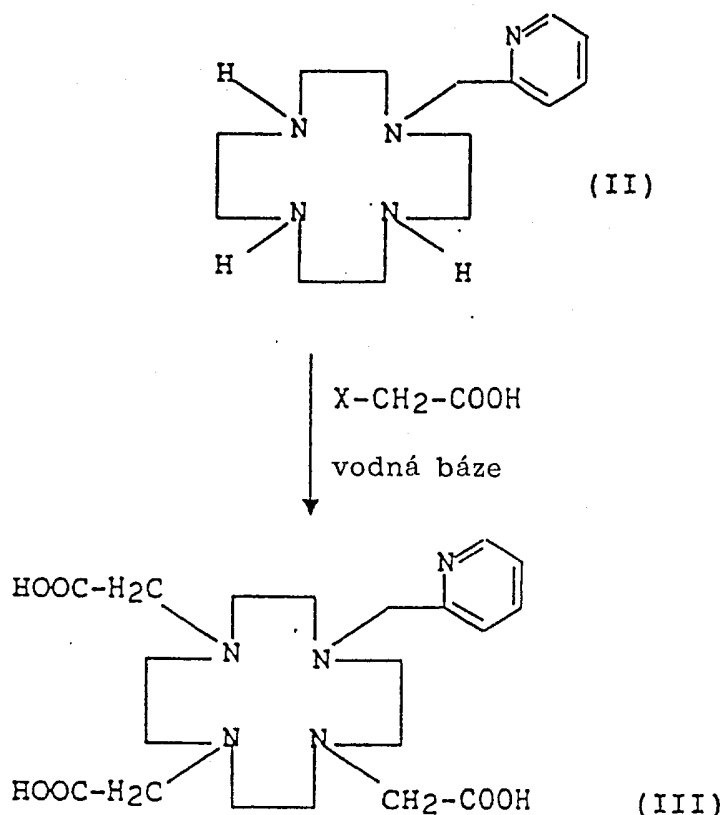
například soli s kyselinou sírovou, kyselinou chlorovodíkovou, kyselinou fosforečnou, kyselinou octovou, kyselinou jantarovou, kyselinou citronovou, kyselinou mléčnou, kyselinou maleinovou, kyselinou fumarovou, kyselinou palmítoovou, kyselinou cholovou, kyselinou palmoovou, kyselinou slizovou, kyselinou glutamovou, kyselinou glukonovou, kyselinou d-kafrovou, kyselinou glutarovou, kyselinou glykolovou, kyselinou ftalovou, kyselinou vinnou, kyselinou mravenčí, kyselinou laurovou, kyselinou stearovou, kyselinou salicylovou, kyselinou methansulfonovou, kyselinou benzensulfonovou, kyselinou sorbovou, kyselinou pikrovou, kyselinou benzoovou, kyselinou skořicovou apod. Tyto soli je možno vyrobit standardními reakcemi. Do rozsahu tohoto pojmu spadají také soli vytvořené standardními reakcemi za použití bází z jak organických, tak anorganických zdrojů, jako jsou amonium, 1-deoxy-1-(methylamino)-d-glucitol, ionty alkalických kovů, ionty kovů alkalických zemin a jiné podobné ionty. Obzvláštní přednost se dává solím sloučenin obecného vzorce I s draslíkem, sodíkem nebo amoniem nebo jejich směsmi.

Sloučeniny obecného vzorce I je možno vyrobit různými postupy. Typické obecné syntetické přístupy k takovým postupům jsou uvedeny v následujících reakčních schématech.

Výchozí látka obecného vzorce II, uvedená v těchto schématech, se připravuje alkylací 1,4,7,10-tetraazacyklo-dodekanu (cyklenu) 2-chlormethylpyridinem při teplotě místnosti v inertním organickém rozpouštědle, jako je chloroform.

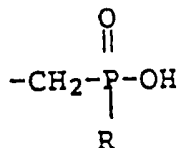
Podle schématu 1 se připravují sloučeniny obecného vzorce I, kde všechny skupiny T představují skupiny vzorce $-\text{CH}_2-\text{COOH}$.

S c h e m a 1



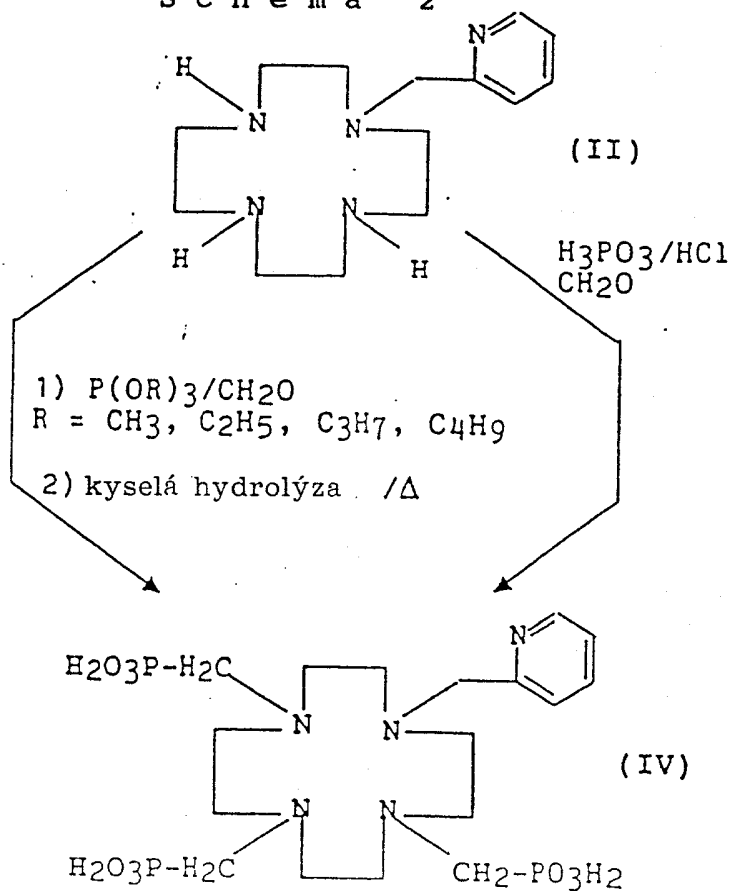
Vodnou bází je hydroxid alkalického kovu, jako hydroxid sodný nebo hydroxid draselný. Hodnota pH reakční směsi se udržuje v rozmezí od asi 8 do asi 12. Teplota leží přibližně v rozmezí od 60 do 90°C. Tlak není rozhodující, a proto se obvykle pracuje za tlaku okolí.

Podle schematu 2 se připravují sloučeniny obecného vzorce I, kde všechny skupiny T představují skupiny vzorce



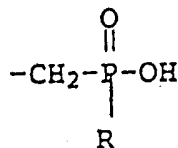
kde R představuje hydroxyskupinu.

S c h e m a 2



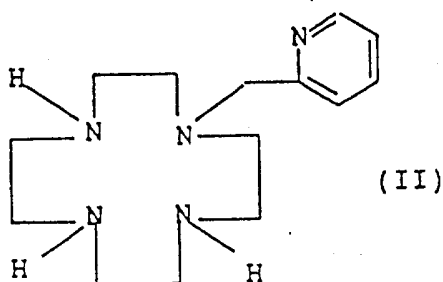
Hydrolyzá podle schematu 2 se provádí za známých podmínek v prostředí vodné kyseliny, například za použití 3 až 12M kyseliny chlorovodíkové. Hodnota pH reakční směsi se udržuje pod 3. Pracuje se při teplotě zpětného toku reakční směsi. Tlak není rozhodující, a proto se obvykle pracuje za tlaku okolí. Alternativně, pokud se reakce provádí v jednom stupni, se používá kyseliny fosforité, kyseliny chlorovodíkové a nadbytku formaldehydu. Při tom se udržuje pH reakční směsi pod hodnotou 2 a pracuje se při teplotě zpětného toku. Ani při tomto provedení není tlak kritický, a proto se pracuje za tlaku okolí.

Podle schematu 3 se připravují sloučeniny obecného vzorce I, kde všechny skupiny T představují skupiny vzorce

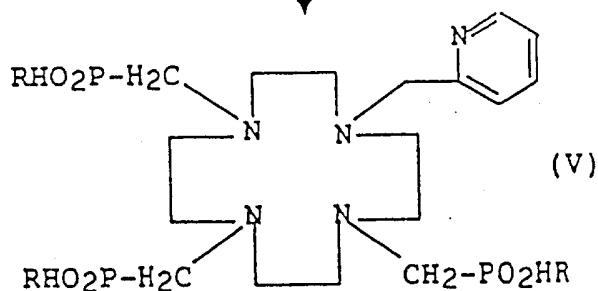


kde R představuje alkoxykupinu s 1 až 5 atomy uhlíku.

S c h e m a 3



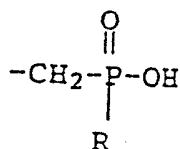
- 1) $\text{P}(\text{R})_3/\text{CH}_2\text{O}$
2) bázická hydrolýza/ Δ



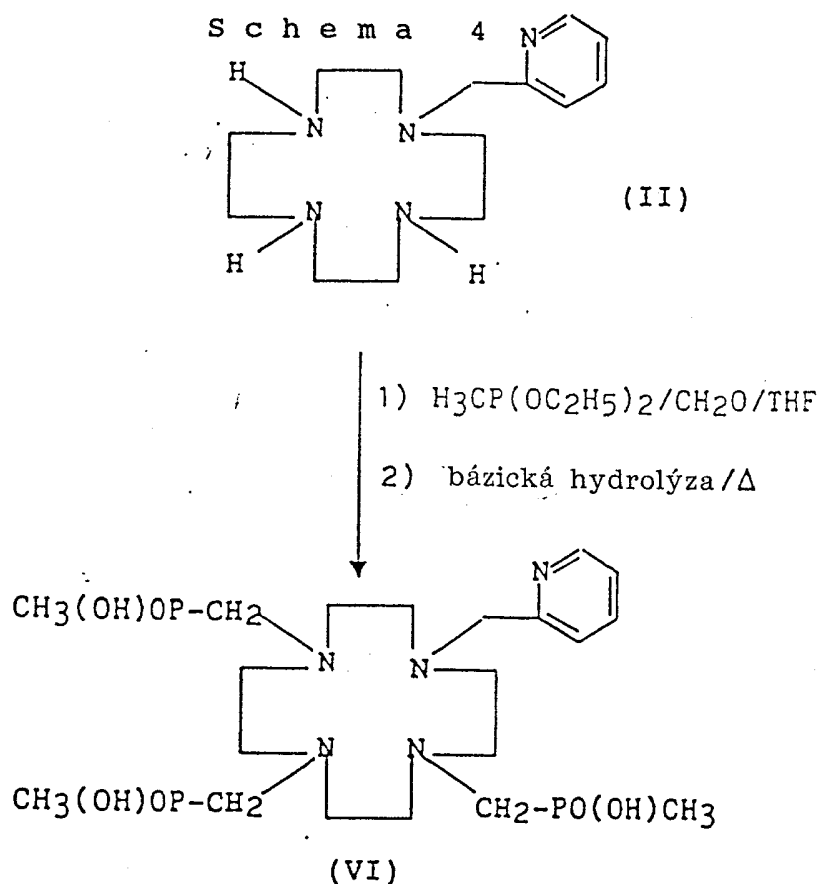
kde R představuje alkoxykupinu s 1 až 5 atomy uhlíku.

Hydrolýza podle schematu 3 se provádí za známých podmínek v prostředí vodné báze, jako například za použití nadbytku hydroxidu alkalického kovu, jako je hydroxid sodný nebo hydroxid draselný. Hodnota pH reakční směsi se udržuje nad 9 a pracuje se při teplotě zpětného toku reakční směsi. Vzhledem k tomu, že tlak není kritický, pracuje se při tlaku okolí.

Podle schematu 4 se připravují sloučeniny obecného vzorce I, kde všechny skupiny T představují skupiny vzorce



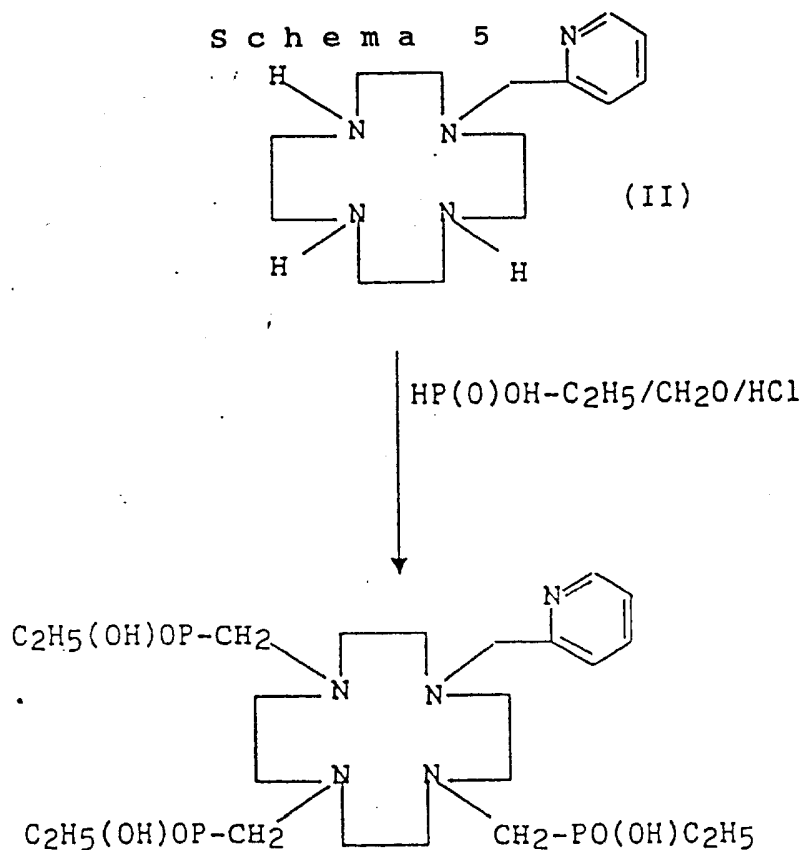
kde R představuje alkylskupinu s 1 až 5 atomy uhlíku. Ve schematu 4 je konkrétně ilustrována příprava sloučenin obecného vzorce I, kde R představuje methylskupinu.



Hydrolyza podle schematu 4 se provádí za známých podmínek v prostředí vodné báze, jako například za použití nadbytku hydroxidu alkalického kovu, jako je hydroxid sodný nebo hydroxid draselný. Hodnota pH reakční směsi se udržuje nad 9 a pracuje se při teplotě zpětného toku reakční směsi.

Vzhledem k tomu, že tlak není kritický, pracuje se při tlaku okolí.

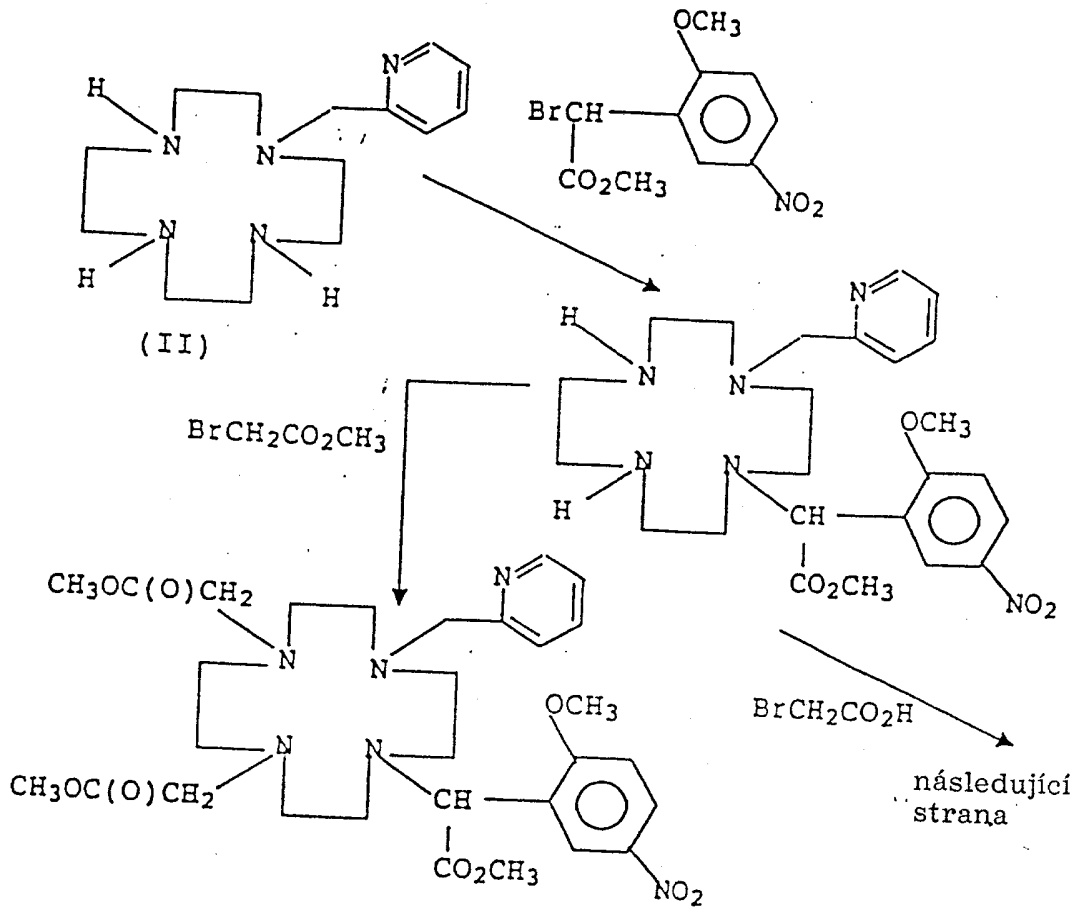
Podle schematu 5 se připravují sloučeniny obecného vzorce I, kde R představuje ethylskupinu



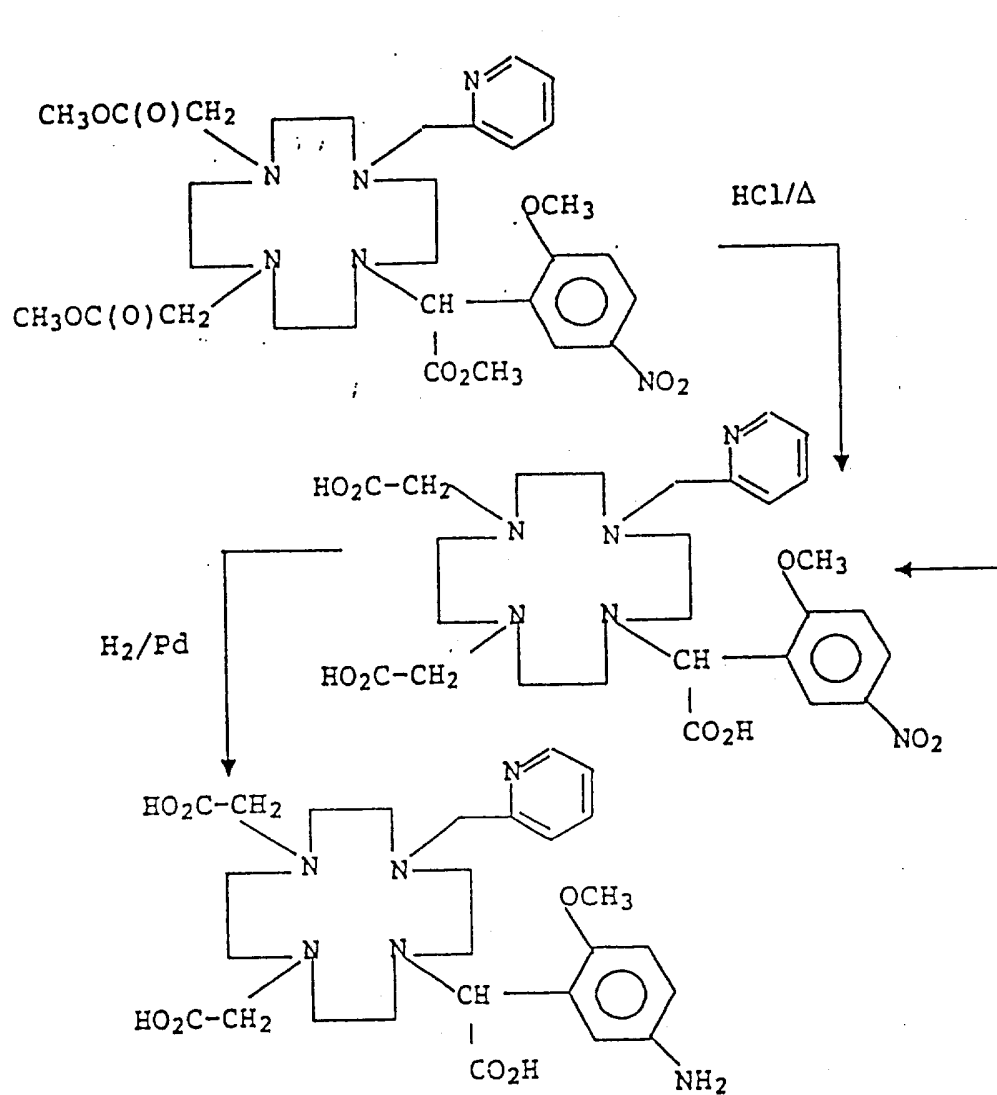
Reakce znázorněná ve schematu 5 se provádí za kyselých podmínek, které se realizují přidavkem kyseliny chlorovodíkové. Hodnota pH reakční směsi se udržuje pod 3 a pracuje se při teplotě zpětného toku reakční směsi. Vzhledem k tomu, že tlak není kritický, pracuje se při tlaku okolí.

Podle schematu 6 se připravují sloučeniny obecného vzorce I, kde skupina T obsahuje bifunkční zbytek.

S c h e m a 6

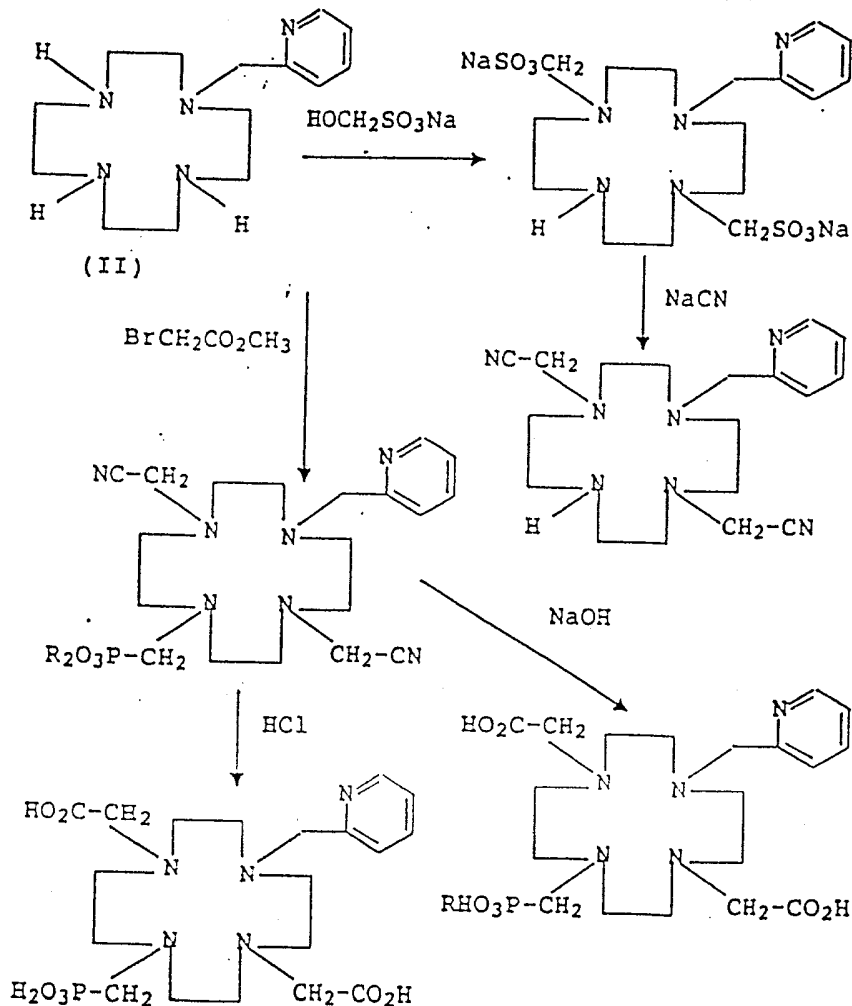


S c h e m a 6 - pokračování



Podle schematu 7 se připravují sloučeniny obecného vzorce I, kde jeden ze symbolů T představuje skupinu vzorce PO₃HR, kde R má význam uvedený u obecného vzorce I a zbývající dva symboly T představují karboxyskupiny.

S c h e m a 7



Hydrolytické stupně uvedené ve schematu 7 se provádějí způsoby vysvětlenými v dříve uvedených schemech. Při reakci s adičním komplexem formaldehydu s hydrogensířičitanem se pracuje za alkalických podmínek ve vodném prostředí, aby došlo k selektivní alkylaci v polohách 4 a 10. Potom se selektivně zavede fosfonátová skupina do polohy 7.

Obecné popisy způsobů, kterých je možno použít ve specifických stupních postupů znázorněných ve výše uvedených schemech, jsou pro ilustraci uvedeny dále.

Karboxylátové deriváty popsané ve schematu 1 se připravují konvenčními alkylačními postupy za použití kyseliny chlor- nebo bromoctové a za zásadických podmínek ve vodném prostředí.

Deriváty kyseliny fosfonové znázorněné ve schematu 2 je možno připravit tak, že se nejprve amin alkyluje trialkylfosfitem a paraformaldehydem za vzniku organického rozpustného peresteru. Tento ester se potom hydrolyzuje v refluxující kyselině za vzniku požadované aminofosfonové kyseliny. Alternativně se tato fosfonová kyselina může připravit za kyselých podmínek za použití kyseliny fosforité v kombinaci s formaldehydem a kyselinou chlorovodíkovou.

Poloestery fosfonové kyseliny se podle schematu 3 připravují tak, že se nejprve vytvoří dialkylester fosfonové kyseliny, který se následně hydrolyzuje za zásadických podmínek. Zásadickou hydrolyzou vzniklá výlučně poloester.

Ve schematu 4 je ilustrován způsob syntézy methylfosfinátových derivátů za použití diethoxymethylfosfinu, jako nukleofilního činidla a paraformaldehydu. Kondenzace se může provádět v rozpouštědlech, jako je tetrahydrofuran, dimethylformamid, dioxan, acetonitril nebo alkohol. Výsledný fosfinátový ester se potom hydrolyzuje za kyselých podmínek (například v 6N kyselině chlorovodíkové při teplotě 80 až 100°C) nebo za zásadických podmínek (za přítomnosti nadbytku báze při teplotě 40 až 100°C) za vzniku odpovídající methylfosfonové kyseliny. Jak je to znázorněno ve schematu 5, pro výrobu fosfinátových derivátů vykazujících zvýšený lipofilní charakter se může alternativně použít metody, kterou navrhli A. D. Sherry et al., Inorg. Chem. (zasláno 1991) za použití ethylfosfonové kyseliny vytvořené in situ.

Ve schématu 6 je ilustrována příprava bifunkčních sloučenin obecného vzorce I, které je potom možno připojit k biologicky aktivním látkám.

Ve schématu 7 je znázorněn obecný postup pro selektivní alkylation v polohách 4 a 10 za použití adiční sloučeniny formaldehydu s hydrogensířičitanem. Vzniklý meziprodukt se potom převede na odpovídající nitril a následně se zavede fosfonátová skupina do polohy 7. Požadované konečné hydrolyzované produkty se získají hydrolyzou za kyselých nebo zásadických podmínek.

Jako kovových iontů se při výrobě komplexů podle vynálezu používá iontů Gd^{3+} , Mn^{2+} a Fe^{3+} , které jsou obchodně dostupné, například od firmy Aldrich Chemical Company. Komplementárním anionem je přitom halogenidový anion, přednostně chloridový anion, nebo se jedná o nesolnou formu (oxid kovu).

Pod označením "paramagnetický nuklid" se v popisu tohoto vynálezu rozumí kovový ion vykazující spinový úhlový moment a/nebo orbitální úhlový moment. Tyto dva typy momentů se kombinují za vzniku pozorovaného paramagnetického momentu způsobem, který z hlavní části závisí na atomech nesusoucích nepárový elektron a z menší části na prostředí těchto atomů. Z paramagnetických nuklidů se při provádění tohoto vynálezu ukázaly jako užitečné ionty gadolinia (Gd^{3+}), železa (Fe^{3+}) a manganu (Mn^{2+}), přičemž iontu Gd^{3+} se dává přednost.

Komplexy se připravují způsoby o sobě známými v tomto oboru, jako například způsobem popsaným v *Chelating Agents and Metal Chelates*, Dwyer & Mellor, Academic Press (1964), kapitola 7. Způsoby výroby aminokyselin jsou například popsány v publikaci *Synthetic Production and Uti-*

lization of Amino Acids (Ed. Kameko et al.) John Wiley & Sons (1974). Jako příklad výroby komplexu je možno uvést reakci bicyklopolyazamakrocyclofosfonové kyseliny s kovovým iontem za vodných podmínek při pH v rozmezí od 5 do 7. Ke vzniku komplexu dochází vytvořením chemické vazby, jejímž důsledkem je stabilní složení paramagnetického nuklidu. Tak například je tento komplex stálý vůči oddělení paramagnetického nuklidu od ligandu.

Komplexy podle vynálezu se podávají při molárním poměru ligandu ke kovu přinejmenším asi 1 : 1, přednostně v rozmezí od 1 : 1 do 3 : 1 a zvláště pak od 1 : 1 do 1,5 : 1. Velký nadbytek ligandu je nežádoucí, poněvadž nekomplexovaný ligand může být vůči živočichu toxický nebo může vyvolávat zástavu srdeční činnosti nebo hypokalcemické křeče.

Farmaceutické prostředky podle vynálezu je možno vyrábět za použití fyziologicky vhodných nosičů excipientů nebo vehikul. Způsoby výroby takových prostředků jsou o sobě známé. Prostředky mohou mít podobu suspenzí, injekčních roztoků nebo jiných vhodných forem. Může se používat fyziologicky vhodných suspenzních médií popřípadě obsahujících přídatné adjuvanty.

Pro diagnostické účely se prostředků podle vynálezu používá v "účinném množství". Podaná dávka se bude měnit v závislosti na chorobě nebo fyzických parametrech živočicha, jako je jeho hmotnost. Pod diagnostickými postupy za použití prostředků podle vynálezu se také rozumějí diagnostické postupy prováděné in vivo.

Z jiných použití některých chelatačních činidel podle vynálezu je možno uvést odstraňování nežádoucích kovů (například železa) z těla, připojování k polymerním nosičům pro různé účely, například za účelem získání diagnostických

činidel a odstraňování kovových iontů selektivní extrakcí. Ligandů obecného vzorce I obsahujících přinejmenším dvě skupiny R ve zbytcích T představovaných skupinami vzorce $-\text{CH}_2-\text{P}(\text{O})\text{ROH}$, je možno použít pro regulaci kovových iontů, jako inhibitorů vzniku úsad. Některých z těchto ligandů se může použít v množstvích nižších než jsou množství stechiometrická. Podobná použití jsou známa pro sloučeniny popsané v US patentech číslo 2 609 390, 3 331 773, 3 336 221 a 3 434 969.

Vynález je blíže objasněn v následujících příkladech provedení. Tyto příklady mají výhradně ilustrativní charakter a rozsah vynálezu v žádném ohledu neomezují.

Příklady provedení vynálezu

Pod označením "LC" se rozumí kapalinová chromatografie. Příslušná čištění se provádějí za nízkého tlaku za použití systému Dionex 2010i vybaveného ručně plněnou kolonou s anexovou pryskyřicí Q-Sepharose^(R) o rozměrech 23 x 2 cm.

Obecný postup zjišťování stability za různých podmínek pH

Připraví se zásobní roztok značícího chloridu gadolinitého $^{159}\text{GdCl}_3$ (nebo značícího chloridu samaritého $^{153}\text{SmCl}_3$) tak, že se 2 μl roztoku značícího chloridu gadolinitého $^{159}\text{GdCl}_3$ v 0,1N kyselině chlorovodíkové o koncentraci $3 \times 10^{-4}\text{M}$ přidají ke 2 ml nosičového roztoku chloridu gadolinitého o koncentraci $3 \times 10^{-4}\text{M}$. Vhodný roztok ligandu se potom připraví v deionizované vodě. Komplex ligand/kov 1 : 1 se vyrobí tak, že se ligand (rozpuštěný ve 100 až 500 μl deionizované vody) smíchá se 2 ml zásobního roztoku značeného chloridu gadolinitého $^{159}\text{GdCl}_3$ a potom se vzniklá směs důkladně promísí za vzniku kyselého roztoku o pH = 2.

Hodnota pH vzniklého roztoku se pomocí 0,1N hydroxidu sodného zvýší na 7,0. Procentický obsah kovu ve formě komplexu se stanoví tak, že se vzorek roztoku komplexu nechá projít sloupcem Sephadex^(R)G-50 za použití roztoku chloridu sodného 4 : 1 (85% roztok chloridu sodného v hydroxidu amonném). Sbírají se frakce 2 x 3 ml. Obsah radioaktivity ve spojených eluátech se potom porovná s obsahem radioaktivity, který zůstal v pryskyřici (nekomplexovaný kov zůstává zachycen v pryskyřici). Profil stability za různých podmínek pH se zjistí tak, že se hodnota pH alikvotu roztoku komplexu upraví pomocí 1M hydroxidu sodného nebo 1M kyseliny chlorovodíkové a stanoví se procentický podíl kovu existujícího v podobě komplexu za použití ionexové metody popsané výše. Na základě experimentálního srovnání je známo, že výsledky dosažené se samariem jsou totožné pro komplexaci a biodistribuci ligandů podle tohoto vynálezu.

Syntéza ligandů

Materiály a metody

Všechna reakční činidla pocházejí z obchodních zdrojů a používá se jich bez dalšího čištění. Spektra NMR se zaznamenávají pomocí spektrometru Bruker AC-250 MHz, který je vybaven multinukleární probou quad (¹H, ¹³C, ³¹P a ¹⁹F) při 297 K, pokud není uvedeno jinak. ¹H spektra v D₂O se zaznamenávají za použití sekvence potlačení pulsu rozpouštědlem ("PRESAT", homonukleární presaturace). ¹H spektra se vztahují k residuálnímu chloroformu (v CDCl₃) při δ 7,26 nebo externímu dioxanu (v D₂O) při δ 3,55. Uváděná ¹³C a ³¹P spektra jsou spektra s dekopulovaným protonem (široký pás). Přiřazení ¹³C (¹H) chemických posunů je umožněno pokusy DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer). Uváděná spektra ¹³C (¹H) jsou vztažena k centrálnímu píku CDCl₃ při δ 77,00 (v CDCl₃) a externímu dioxanu

při δ 66,66 (v D₂O). Uváděná spektra ³¹P (¹H) jsou vztažena k externí 85% kyselině orthofosforečné při δ 0,00. Teploty tání se stanovují tavením v kapiláře a nejsou korigovány. Semipreparativní ionexové chromatografické separace se provádějí za nízkého tlaku (za tlaku nižšího než 4,122 MPa) za použití standardní skleněné kolony ručně naplněné anexovou pryskyřicí Q-Sepharose^(R) nebo standardní skleněné kolony naplněné katexovou pryskyřicí SP-Sepharose^(R) s UV detektorem (263 nm) připojeným "on line" pro monitorování eluentu. Spektra GC/MS se měří pomocí systému Hewlett Packard 5890A Gas Chromatograph/5970 Mass Selective Detector.

Výchozí látky

P ř í k l a d A

Příprava N-(2-pyridylmethyl)-1,4,7,10-tetraazacyklododekanu

Roztok 2-pikolylochloridu v chloroformu se vyrobí tak, že se 3 ml vodného roztoku 1,03 g (6,3 mmol) hydrochloridu 2-pikolylochloridu zalkalizují na pH vyšší než 14 a získaný roztok se extrahuje chloroformem. K míchanému chloroformovému roztoku 2,03 g (11,8 mmol) 1,4,7,10-tetraazacyklododekanu se v jedné dávce přidá 10 ml připraveného roztoku 2-pikolylochloridu v chloroformu. Reakční směs se míchá 30 minut při teplotě místnosti a zkoncentruje za sníženého tlaku. Zbytek se chromatografuje na silikagelu (sloupec 2,5 x 20 cm) za použití směsi trichlormethanu, methanolu a chloridu amonného v poměru 10 : 4 : 1, jako elučního činidla, $R_f = 0,29$ na silikagelových deskách. Eluát se zkoncentruje a izoluje se monoalkylovaný produkt ve formě husté světle žluté kapaliny, která během stání ztuhne. Získá se 1,17 g špinavě bílého prášku (72 %, vzhledem k 2-pikolylochloridu), který se dále charakterizuje:

^1H NMR (CDCl_3):

δ 2,54 - 2,82 (m, 16H), 3,75 (s, 2H), 7,11 - 7,14 (m, 1H),
7,42 - 7,46 (m, 1H), 7,64 - 7,65 (m, 1H), 8,46 - 8,48 (m,
1H) a

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3):

δ 45,02, 46,31, 47,04, 51,51, 61,03, 122,04, 122,87, 136,61,
148,83, 150,53.

P ř í k l a d B

Příprava N-(2-pyridylmethyl)-N',N'',N'''-tris(methylendiethylfosfonát)-1,4,7,10-tetraazacyklododekanu

K 331 mg (1,27 mmol) N-(2-pyridylmethyl)-1,4,7,10-tetraazacyklododekanu vyrobeného podle příkladu A se přidá 229 mg (7,63 mmol, přebytek) paraformaldehydu a 1,3 ml (1,27 g, 7,62 mmol, přebytek) triethylfosfitu. Poté se směs 10 minut mírně míchá. Získaná dobře promísená suspenze se 1 hodinu zahřívá na 90°C. Přebytek výchozích látek a vedlejší produkty se odstraní za sníženého tlaku (125°C/1,33 Pa). Získá se 896 mg (99 %) požadovaného produktu ve formě žlutého oleje, který se dále charakterizuje:

^1H NMR (CDCl_3):

δ 1,25 - 1,39 (m, 18H), 2,66 - 2,95 (m, 22H), 3,71 (s, 2H),
4,01 - 4,22 (m, 12H), 7,10 - 7,15 (m, 1H), 7,57 - 7,65 (m,
2H), 8,46 - 8,52 (m, 1H);

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3):

δ 16,38, 16,46, 50,45, 50,67, 52,41, 53,19, 53,29, 53,48,
53,58, 61,37, 61,47, 61,52, 121,67, 123,28, 136,19, 148,61,
159,90 a

$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 297 K)

δ 26,21;

$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 217 K)

δ 24,18 (1P), 24,32 (2P).

P ř í k l a d C

Příprava N-(2-pyridylmethyl)-N',N'',N'''-tris(methylendi-propylfosfonát)-1,4,7,10-tetraazacyklododekanu

K 445 mg (1,71 mmol) N-(2-pyridylmethyl)-1,4,7,10-tetraazacyklododekanu vyrobeného podle příkladu A se přidá 154 mg (5,12 mmol, přebytek) paraformaldehydu a 3,5 ml (3,20 g, 5,12 mmol, přebytek) tripropylfosfitu. Poté se směs 10 minut mírně míchá. Získaná dobře promísená suspenze se 30 minut zahřívá na 100°C. Přebytek výchozích látek a vedlejší produkty se odstraní za sníženého tlaku (4 hodiny při 160°C/1,33 Pa). Získá se 1,36 g (kvantitativní výtěžek) požadovaného produktu ve formě hustého žlutého oleje, který se dále charakterizuje:

^1H NMR (CDCl_3):

δ 0,91 - 1,00 (m, 18H), 1,60 - 1,76 (m, 12H), 2,67 - 2,99 (m, 22H), 3,73 (s, 2H), 3,94 - 4,08 (m, 12H), 7,12 - 7,15 (m, 1H), 7,46 - 7,67 (m, 2H), 8,84 - 8,52 (m, 1H);

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3):

δ 9,93, 10,21, 23,71, 23,80, 50,17, 50,44, 52,38, 53,09, 53,44, 61,44, 66,79, 66,83, 121,61, 123,23, 136,14, 148,54, 159,92 a

$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3)

δ 26,20 (1P), 26,23 (2P).

Příprava konečných sloučenin

Ligandy: Příprava dimethylenkarboxylových kyselin je popsána ve schématu 1.

P ř í k l a d 1

Příprava N-(2-pyridylmethyl)-N',N'',N'''-trioctová kyselina-
1,4,7,10-tetraazacyklododekanu (PD3A)

Ke 2 ml vodného roztoku 201,4 mg (0,51 mmol) N-(2-pyridylmethyl)-1,4,7,10-tetraazacyklododekanu, připraveného podle příkladu A, se přidá 350 mg (2,52 mmol, 65% přebytek) bromoctové kyseliny. K reakční směsi se přidávají malé dávky koncentrovaného hydroxidu sodného, aby se hodnota pH udržovala nad 11. Hydroxid sodný se přidává tak dlouho, dokud se nedosáhne ustálení pH nad 11 (asi 30 minut). Reakční směs se poté 1 hodinu zahřívá na 60°C, ochladí na teplotu místnosti a její pH se nastaví na 7. Neutrální roztok se chromatografuje na sloupci katexové pryskyřice (SP-Sepharose^(R), 1,5 x 50 cm), přičemž eluce se provádí nejprve deionizovanou vodou a poté 1M kyselinou chlorovodíkovou. Kyselá frakce, která obsahuje produkt, se odpaří do sucha a zbytek se poté azeotropicky odpaří s čerstvou deionizovanou vodou (3 x 2 ml), aby se odstranil přebytek kyseliny chlorovodíkové. Vodný roztok se lyofilizuje, čímž se získá konečný produkt ve formě bílé pevné látky, který se dále charakterizuje

¹H NMR (D₂O):

δ 2,79 - 4,13 (m, 24H), 7,88 - 8,01 (m, 2H), 8,35 - 8,42 (m, 1H), 8,63 - 8,66 (m, 1H) a

¹³C(¹H)NMR (D₂O):

δ 51,04, 51,25, 53,73, 55,47, 56,00, 56,90, 57,52, 129,86, 131,21, 145,49, 150,82, 153,54, 171,61, 178,76.

Ligandy: Příprava dimethylenfosfonátových poloesterů je ilustrována ve schématu 3.

P ř í k l a d 2

Příprava N-(2-pyridylmethyl)-N',N'',N'''-tris(methylenfosfo-
nová kyselina-ethylester)-1,4,7,10-tetraazacyklododekanu
(PD3EP)

N-(2-Pyridylmethyl)-N',N'',N'''-tris(methylendi-
ethylfosfonát)-1,4,7,10-tetraazacyklododekan (102,7 mg, 0,14
mol), připravený podle příkladu B, se smísí s 1 ml 0,1M
roztoku hydroxidu draselného a směs se 6 hodin zahřívá na
90°C. Po ochlazení na teplotu místnosti se vodný roztok
lyofilizuje. Získaná žlutohnědá pevná látka se chromato-
grafuje na sloupci anexu (Q-Sepharose^(R), 1,5 x 50 cm),
přičemž eluce se provádí nejprve deionizovanou vodou a poté
1M kyselinou chlorovodíkovou. Potom se eluát lyofilizuje.
Získaný produkt, který se izoluje ve formě hnědé pevné
látky, se dále charakterizuje:

¹H NMR (D₂O, 338 K):

δ 1,41 - 1,57 (m, 9H), 3,28 - 3,89 (m, 22H), 4,09 - 4,64 (m,
8H), 8,22 - 8,26 (m, 2H), 8,70 - 8,75 (m, 1H), 9,00 - 9,12
(m, 1H);

¹³C(¹H)NMR (D₂O, 338 K):

δ 19,41, 19,51, 52,58, 53,00, 52,31, 53,75, 53,82, 56,04,
59,53, 64,60, 64,76, 129,86, 131,41, 147,31, 149,06, 154,34

a

³¹P(¹H)NMR (D₂O, 338 K):

δ 9,64 (2P), 19,79 (1P).

P ř í k l a d 3

Příprava N-(2-pyridylmethyl)-N',N'',N'''-tris(methylenfosfo-
nová kyselina-propylester)-1,4,7,10-tetraazacyklododekanu
(PD3PP)

N-(2-Pyridylmethyl)-N',N'',N'''-tris(methylendi-propylfosfonát)-1,4,7,10-tetraazacyklododekan (0,71 g, 0,89 mmol), připravený podle příkladu C, se smísí se 3 ml 0,1M roztoku hydroxidu draselného a směs se 18 hodin zahřívá ke zpětnému toku. Po ochlazení na teplotu místnosti se vodný roztok pře-filtruje a filtrát se lyofilizuje. Získaný hnědý zbytek se znovu rozpustí ve směsi dichlormethanu a ethanolu v poměru 95 : 5. Rozpoutědlo se odpaří a zbytek se vysuší za vakua. Získaný produkt, který se izoluje ve formě hnědé pevné látky, se dále charakterizuje:

^1H NMR (D_2O , 353 K):

δ 1,24 - 1,36 (m, 9H), 1,95 - 2,04 (m, 6H), 3,03 - 3,29 (m, 22H), 4,10 - 4,25 (m, 8H), 7,74 - 7,92 (m, 2H), 8,23 - 8,29 (m, 1H), 8,87 - 8,96 (m, 1H);

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (D_2O , 353 K):

δ 13,15, 27,20, 50,43, 53,89, 54,48, 54,98, 55,42, 64,33, 69,41, 126,38, 128,30, 141,24, 152,46, 161,45 a

$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (D_2O , 353 K):

δ 21,61 (2P), 21,95 (1P).

Komplexy: příprava komplexů kov/ligand pro biodistribuční studie

Obecný postup

Komplexy kov/ligand se připravují různými metodami. Při těchto metodách se ve vodném roztoku smíchá kov s ligandem a pH se nastaví na požadovanou hodnotu. Tvorba komplexů probíhá v roztocích, které kromě vody obsahují také soli a/nebo pufrů. V některých případech se zjistí, že se dosáhne vyššího výtěžku komplexu v případě zahřátých roztoků, než když se tvorba komplexu provádí při teplotě okolí.

Postupuje se například takto: Rozpuštěním ligandu v deionizované vodě (o pH asi 2) se vyrobí roztok ligandu. Potom se vyrobí komplex ligand/kov smísením roztoku ligandu s vodným roztokem monohydrátu chloridu samaritého ($3 \times 10^{-4} \text{M}$ v 0,01N kyselině chlorovodíkové) s obsahem značícího chloridu samaritého $^{153}\text{SmCl}_3$. Po důkladném promísení se stanoví procentický podíl kovu převedený do komplexu tak, že se vzorek roztoku komplexu nechá projít sloupcem Sephadex^(R) za použití roztoku chloridu sodného 4 : 1 (0,85% roztok chloridu sodného v hydroxidu amonném). Sbírají se frakce 2 x 3 ml. Obsah radioaktivity ve spojených eluátech se potom porovná s obsahem radioaktivity, který zůstal v pryskyřici (za těchto podmínek se komplex odstraňuje s elučním činidlem a nekomplexovaný kov zůstává zachycen v pryskyřici). Tímto způsobem se zjistí, že stupeň převedení do komplexu je obvykle asi 95 % nebo vyšší.

Výše uvedeným postupem se vyrobí komplexy samaria s

N-(2-pyridylmethyl)-N',N'',N'''-trioctová kyselina-1,4,7,10-tetraazacyklododekanem (PD3A);

N-(2-pyridylmethyl)-N',N'',N'''-tris(methylenfosfonová kyselina-ethylester)-1,4,7,10-tetraazacyklododekanem (PD3EP);

N-(2-pyridylmethyl)-N',N'',N'''-tris(methylenfosfonová kyselina-propylester)-1,4,7,10-tetraazacyklododekanem (PD3PP) a

N-(2-pyridylmethyl)-N',N'',N'''-tris(methylenfosfonová kyselina)-1,4,7,10-tetraazacyklododekanem (PD3P).

Komplexy gadolinia se vyrobí podobným způsobem.

Kinetická inertnost komplexů samaria získaných za použití PD3A, PD3PP a PD3EP je uvedena v následujících tabulkách.

Profil stability komplexu $^{153}\text{Sm-PD3A}$ za různých podmínek pH

pH	komplex (%)
1	98,30
2	99,38
4	99,63
7	99,86
9	99,86
11	99,80
14	99,96

Profil stability komplexu $^{153}\text{Sm-PD3PP}$ za různých podmínek pH

pH	komplex (%)
1	72,52
3	87,56
5	92,99
7	95,06
9	95,22
11	92,74
14	87,65

Profil stability komplexu $^{153}\text{Sm-PD3EP}$ za různých podmínek pH

pH	komplex (%)
1	78,95
3	93,80
5	93,02
7	93,77
9	95,89
11	95,77
14	94,07

Biodistribuce

Obecný postup

Krysy Sprague Dawley se nechají aklimatizovat po dobu 5 dnů a potom se jim ocasní vénou vstříkne 100 μl roztoku komplexu. V době podání injekce mají krysy hmotnost v rozmezí od 150 do 200 g. Po 30 minutách se krysy usmrtí cervikální dislokací a podrobí se pitvě. Množství radioaktivity v každé tkáni se zjistí spočítáním ve scintilačním počítači NaI, který je připojen k vícekanálovému analyzátoru. Pro stanovení procentické dávky v každé tkáni nebo orgánu se počty rozpadů porovnají s počty rozpadů ve 100 μl standardech.

Procentická dávka v krvi se odhadne za použití předpokladu, že krev činí 6,5 % celkové tělesné hmotnosti. Procentická dávka v kostech se odhadne vynásobením procentické dávky ve femuru číslem 25. Procentická dávka ve svalech se odhadne za použití předpokladu, že svaly tvoří 43 % celkové tělesné hmotnosti. Průměrný počet použitých krys je n.

Kromě biodistribuce v orgánech se cheláty sloučenin obecného vzorce I vyhodnocují s ohledem na jejich schopnost umístění v kostech, poněvadž o fosfonátech je známo, že mají schopnost vázat se k hydroxyapatitu. Výsledky těchto zkoušek jsou uvedeny dále.

P ř í k l a d I

Pro komplex $^{153}\text{Sm}/\text{N}-(2\text{-pyridylmethyl})\text{-N}',\text{N}'',\text{N}'''$ -tris(methylenfosfonová kyselina-ethylester)-1,4,7,10-tetraazacyklododekan (^{153}Sm -PD3EP) jsou výsledky uvedeny v tabulce I. Uvedené výsledky představují průměrné hodnoty zjištěné z nejméně dvou krys pro určitý údaj 2 hodiny po injekci.

T a b u l k a I

Biodistribuce ^{153}Sm -PD3EP (procenta injekčně podané dávky)

Orgán	Průměr
Kosti	0,82
Játra	0,36
Ledviny	1,24
Slezina	0,01
Svalstvo	0,62
Krev	0,45
Srdce	0,01
Plíce	0,02
Mozek	0,01
Moč	97,00

P ř í k l a d I I

Pro komplex $^{153}\text{Sm}/\text{N}-(2\text{-pyridylmethyl})\text{-N}',\text{N}'',\text{N}'''$ -tris(methylenfosfonová kyselina-propylester)-1,4,7,10-tetra-

azacyklododekan ($^{153}\text{Sm-PD3PP}$) jsou výsledky uvedeny v tabulce II. Uvedené výsledky představují průměrné hodnoty zjištěné z nejméně tří krys pro určitý údaj 2 hodiny a 24 hodin po injekci.

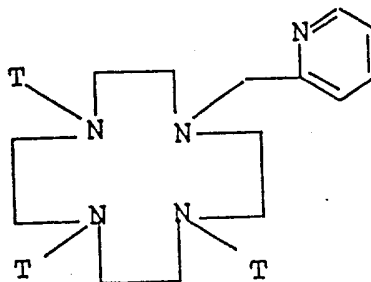
T a b u l k a I

Biodistribuce $^{153}\text{Sm-PD3EP}$ (procenta injekčně podané dávky)

Orgán	Průměr	
	po 2 hodinách	po 24 hodinách
Kosti	5,93	12,39
Játra	20,36	2,31
Ledviny	0,86	0,89
Slezina	1,19	0,22
Svalstvo	0,82	0,27
Krev	0,68	0,03
Srdce	0,04	0,02
Plíce	0,20	0,40
Mozek	0,04	0,00
Žaludek	1,39	0,04
Tenké střevo	13,56	0,13
Tlusté střevo	0,18	0,16
Moč	50,00	83,00
Stolice	--	5,33

Výše uvedený popis uvádí podrobnosti provádění vynálezu. Pro rozsah ochrany jsou rozhodující následující patentové nároky, poněvadž je zřejmé, že i různé modifikace, které v popisu nejsou explicitně uvedeny, spadají do rozsahu vynálezu.

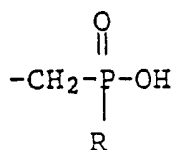
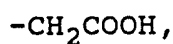
P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. 2-Pyridylmethylenpolyazamacrocyklické sloučeniny
obecného vzorce I

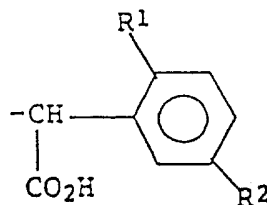
(I)

kde

T nezávisle představuje skupinu vzorce



nebo

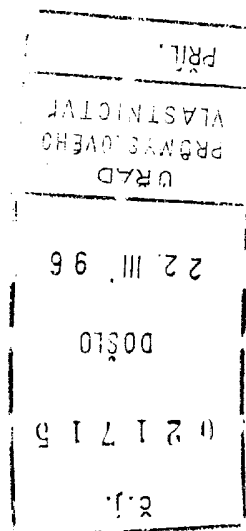


kde

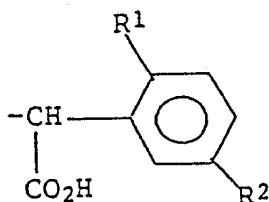
R představuje hydroxyskupinu, alkylskupinu s 1 až 5 atomy uhlíku nebo alkoxyskupinu s 1 až 5 atomy uhlíku;

R¹ představuje hydroxyskupinu nebo methoxyskupinu a

R² představuje nitroskupinu, aminoskupinu, isothio-
kyanatoskupinu, semikarbazidoskupinu, thiosemikar-
bazidoskupinu, maleinimidoskupinu, bromacetamido-
skupinu nebo karboxyskupinu;



příčemž pouze jeden ze zbytků T představuje skupinu obecného vzorce



kde R¹ a R² mají výše uvedený význam;

příčemž alespoň jeden ze symbolů T představuje skupinu vzorce $-\text{CH}_2-\text{P}(\text{O})\text{ROH}$, kde R představuje alkoxy skupinu s 1 až 5 atomy uhlíku;

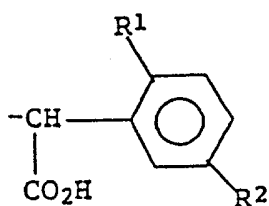
a jejich farmaceuticky vhodné soli.

2. 2-Pyridylmethylenpolyazamakrocyclická sloučenina podle nároku 1 obecného vzorce I, kde T představuje skupinu vzorce $-\text{CH}_2-\text{P}(\text{O})\text{ROH}$, kde R představuje alkoxy skupinu s 1 až 5 atomy uhlíku a její farmaceuticky vhodné soli.

3. 2-Pyridylmethylenpolyazamakrocyclická sloučenina podle nároku 2 obecného vzorce I, kde R představuje ethoxy skupinu s chemickým názvem N-(2-pyridylmethyl)-N',N'',N'''-tris(methylenfosfonová kyselina-ethylester)-1,4,7,10-tetraazacyklododekan a její farmaceuticky vhodné soli.

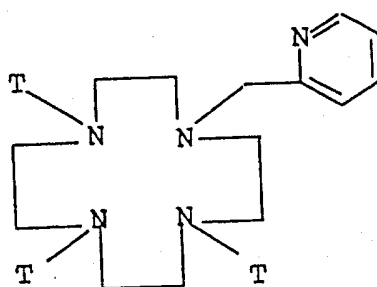
4. 2-Pyridylmethylenpolyazamakrocyclická sloučenina podle nároku 2 obecného vzorce I, kde R představuje propoxy skupinu s chemickým názvem N-(2-pyridylmethyl)-N',N'',N'''-tris(methylenfosfonová kyselina-propylester)-1,4,7,10-tetraazacyklododekan a její farmaceuticky vhodné soli.

5. 2-Pyridylmethylenpolyazamakrocyclické sloučeniny podle nároku 1 obecného vzorce I, kde jeden ze symbolů T představuje skupinu vzorce



kde R^1 a R^2 mají význam uvedený v nároku 1, přičemž ostatní symboly T mají význam uvedený v nároku 1.

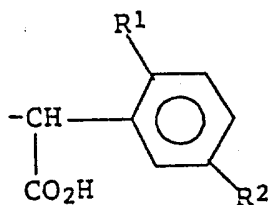
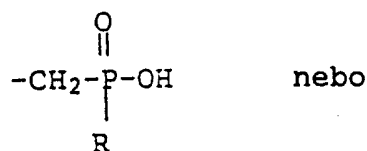
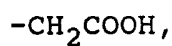
6. Komplex 2-pyridylmetylenpolyazamakrocyclické sloučeniny obecného vzorce I



(I)

kde

T nezávisle představuje skupinu vzorce



kde

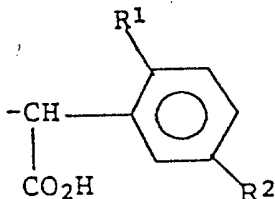
R představuje hydroxyskupinu, alkylskupinu s 1 až 5 atomy uhlíku nebo alkoxyskupinu s 1 až 5 atomy uhlíku;

R^1 představuje hydroxyskupinu nebo methoxyskupinu a

č.j.	076819
DOŠLO	
21. X. 96	
URAD PRŮMYSL. OUVĚHO VLASTNICTVÍ	
PŘÍL.	

R^2 představuje nitroskupinu, aminoskupinu, isothio-
kyanatoskupinu, semikarbazidoskupinu, thiosemikar-
bazidoskupinu, maleinimidoskupinu, bromacetamido-
skupinu nebo karboxyskupinu;

příčemž pouze jeden ze zbytků T představuje skupinu obecné-
ho vzorce



kde R^1 a R^2 mají výše uvedený význam;

příčemž alespoň jeden ze symbolů T představuje skupinu
vzorce $-CH_2-P(O)ROH$, kde R představuje alkoxykupinu s 1 až
5 atomy uhlíku;

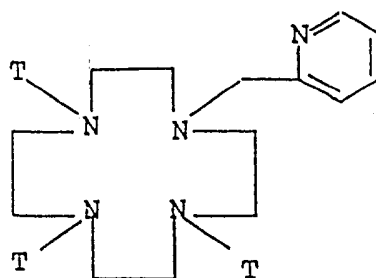
nebo její farmaceuticky vhodné soli s kovovým iontem
zvoleným ze souboru zahrnujícího Gd^{3+} , Mn^{2+} a Fe^{3+} .

7. Komplex podle nároku 6, kde kovovým iontem je
 Gd^{3+} .

8. Komplex podle nároku 6, kde 1 až 3 symboly T
představují skupiny vzorce $-CH_2-P(O)ROH$, kde R představuje
alkoxykupinu s 1 až 5 atomy uhlíku a kovovým iontem je
 Gd^{3+} .

9. Farmaceutický prostředek, v y z n a č u j í -
c í s e t í m , že obsahuje komplex podle nároku 6 a
farmaceuticky vhodný nosič.

10. Způsob výroby 2-pyridylmethylenpolyazamakro-
cyklických sloučenin obecného vzorce I

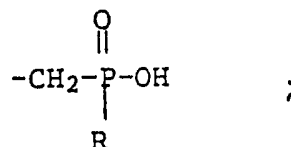


(I)

kde

T nezávisle představuje skupinu vzorce

$-\text{CH}_2\text{COOH}$ nebo

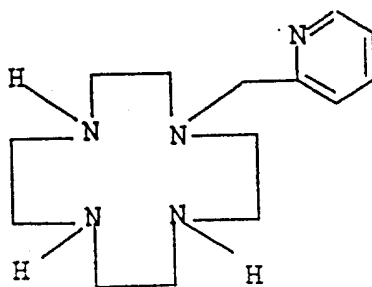


kde

R představuje hydroxyskupinu, alkylskupinu s 1 až 5 atomy uhlíku nebo alkoxyskupinu s 1 až 5 atomy uhlíku;

nebo jejich farmaceuticky vhodných solí, v y z n a č u -
j í c í s e t í m , že se provede některý z postupů
A) až E), přičemž

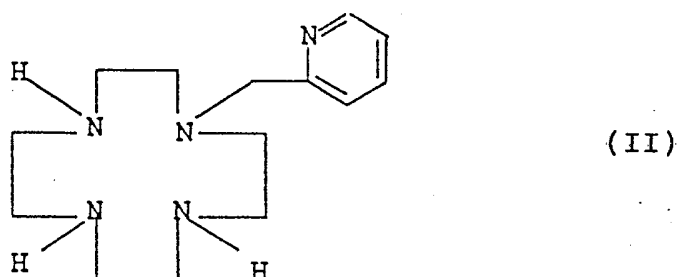
A) pro výrobu sloučeniny obecného vzorce I, kde T představuje skupinu vzorce $-\text{CH}_2-\text{COOH}$ se sloučenina vzorce II



(II)

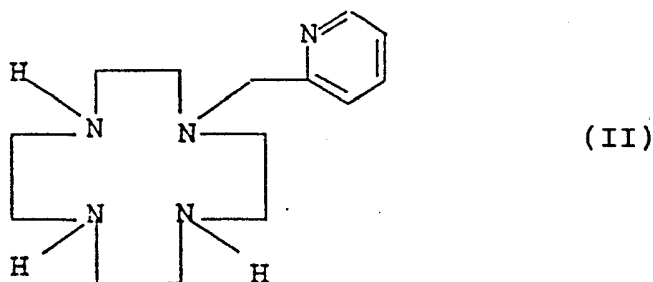
nechá reagovat se sloučeninou obecného vzorce $X-CH_2-COOH$, kde X představuje atom chloru nebo bromu, za přítomnosti vodného hydroxidu alkalického kovu při pH v rozmezí od asi 8 do 10 a při teplotě v rozmezí od asi 60 do asi 90°C;

B) pro výrobu sloučeniny obecného vzorce I, kde T představuje skupinu vzorce $-CH_2-PO_3H_2$ se sloučenina vzorce II



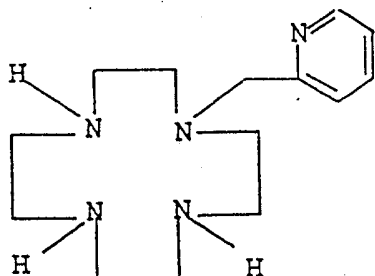
nechá reagovat s kyselinou fosforitou v kyselině chlorovodíkové a nadbytkem formaldehydu při pH nižším než asi 2 a při teplotě zpětného toku;

C) pro výrobu sloučeniny obecného vzorce I, kde T představuje skupinu vzorce $-CH_2-PO_3H_2$ se sloučenina vzorce II



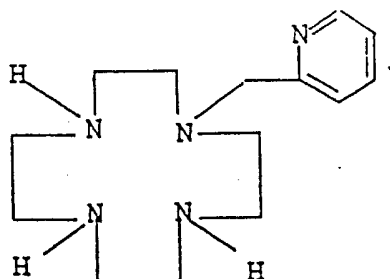
nechá reagovat se sloučeninou obecného vzorce $P(OR)_3$, kde R představuje alkylskupinu s 1 až 4 atomy uhlíku, ve formaldehydu, načež se vzniklý reakční produkt hydrolyzuje 3 až 12M kyselinou chlorovodíkovou při pH nižším než asi 3 a při teplotě zpětného toku;

D) pro výrobu sloučeniny obecného vzorce I, kde T představuje skupinu vzorce $-\text{CH}_2-\text{PO}_2\text{HR}$, kde R představuje alkoxy skupinu s 1 až 5 atomy uhlíku, se sloučenina vzorce II



nechá reagovat se sloučeninou obecného vzorce $\text{P}(\text{OR})_3$, kde R představuje alkylskupinu s 1 až 4 atomy uhlíku, ve formaldehydu, načež se vzniklý reakční produkt hydrolyzuje nadbytkem hydroxidu alkalického kovu při pH vyšším než asi 12 a při teplotě zpětného toku;

E) pro výrobu sloučeniny obecného vzorce I, kde T představuje skupinu vzorce $-\text{CH}_2-\text{PO}(\text{OH})\text{R}$, kde R představuje alkylskupinu s 1 až 5 atomy uhlíku, se sloučenina vzorce II



nechá reagovat se sloučeninou obecného vzorce $\text{H}_3\text{C}-\text{P}(\text{OEt})_2$, kde Et znamená ethylskupinu, ve formaldehydu a tetrahydrofuranu, načež se vzniklý reakční produkt hydrolyzuje nadbytkem hydroxidu alkalického kovu při pH vyšším než asi 12 a při teplotě zpětného toku; nebo se sloučeninou vzorce $\text{HP}(\text{O})\text{OH}-\text{C}_2\text{H}_5$ ve formaldehydu a kyselině chlorovodíkové při pH nižším než asi 3 a při teplotě zpětného toku.