



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **326114**

(13) **B1**

**NORGE**

(51) Int Cl.

*A61K 49/10 (2006.01)*

*C07F 9/09 (2006.01)*

### Patentstyret

---

(21)	Søknadsnr	19973510	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1996.01.16 PCT/US96/00164
(22)	Inng.dag	1997.07.30	(85)	Videreføringsdag	1997.07.30
(24)	Løpedag	1996.01.16	(30)	Prioritet	1995.02.01, US, 382317
(41)	Alm.tilgj	1997.07.30			
(45)	Meddelt	2008.09.29			
(73)	Innehaver	Epix Pharmaceuticals Inc, 4 Maguire Road, MA02421 LEXINGTON, US			
(72)	Oppfinner	Thomas J. McMurry, 4 Bonad Road, MA01890 WINCHESTER, US Hironao Sajiki, Gifu, JP Daniel M. Scott, Acton, MA, US Randall B Lauffer, 33 Heath Hill Avenue, MA02146 BROOKLINE, US			
(74)	Fullmektig	Oslo Patentkontor AS, Postboks 7007 Majorstua , 0306 OSLO			

---

(54)	Benevnelse	<b>Diagnostiske avbildningskontrastmidler med forlenget blodretensjon</b>			
(56)	Anførte publikasjoner	WO 9103200 A			
(57)	Sammendrag				

Den foreliggende oppfinnelse vedrører diagnostiske avbildningskontrastmidler som utviser forbedret blodretensjon De nye forbindelser omfatter:

- en avbildningsfremmende (eller signalgenererende) gruppe (IEM),
- en plasmaproteinbindende gruppe (PPBM); og
- en blodhalveringstidsforlengende gruppe (BHEM).

Denne oppfinnelse vedrører også farmasøytiske sammensetninger omfattende disse forbindelser og fremgangsmåter ved anvendelse av forbindelsene og sammensetninger for blodhalveringstidsforlengelse og kontrastfremming av en diagnostisk avbildning. Disse kontrastmidler utviser reduserte hastighet for både renal og hepacellulært opptak og intet tilsynelatende opptak av RE-systemet. Midlene kan siktes inn mot blodbanen eller enhver annen biologisk komponent. Da midlet tapes mindre lett fra blodstrømmen, kan lavere doseringer anvendes ved en høyere sikkerhetsmargin. Tilnæringsmåten er generell for både store små molekyler.

Den foreliggende oppfinnelse vedrører kontrastmidler i form av chelateringsligander med struktur som angitt i krav 1 for diagnostisk avbildning. Spesielt vedrører oppfinnelsen nye forbindelser som utviser forbedret blodretensjon. Forbindelsen omfatter:

- a.) en avbildningshemmende (eller signalgenererende) gruppe (IEM);
- 5 b.) en plasmaproteinbindende-gruppe (PPBM), og
- c.) en blodhalveringstidsforlengende gruppe (BHEM).

Oppfinnelsen vedrører også diagnostiske sammensetninger omfattende disse forbindelser som angitt i krav 5 og anvendelse av forbindelsene som angitt i krav 7-11.

#### Oppfinnelsens bakgrunn

10 Diagnostiske avbildningsteknikker så som magnetisk resonansavbildning (MRI), røntgen, nukleær radiofarmasøytisk avbildning, ultrafiolett/synlig/infrarødt lys og ultralyd har blitt anvendt ved medisinsk diagnostisering i en rekke år. I noen tilfeller har anvendelsen av kontrastmedia for å bedre avbildningskvaliteten eller tilveiebringe spesifikk informasjon foregått i mange år. I andre tilfeller, så som avbildning med lys eller ultra-  
15 lyd, er introduksjon av kontrastmedia umiddelbart forestående.

Kontrastmidlet må forstyrre bølgelengden for den elektromagnetiske stråling som anvendes ved avbildningsteknikken, endre de fysiske egenskaper av vev for å gi et endret signal, eller, som i tilfellet av radiofarmasøytika, tilveiebringe selve strålingskilden.

20 Hyppig anvendte materialer innbefatter organiske molekyler, metallioner, salter eller chelater, partikler (spesielt jernpartikler) eller merkede peptider, proteiner, polymerer eller liposomer. Etter administrasjon kan midlet diffundere ikke-spesifikt gjennom kroppsrommene før det metaboliseres og/eller utskilles; disse midler er generelt kjent som ikke-spesifikke midler. Alternativt kan midlet ha en spesifikk affinitet for et spesielt kroppsrom, celle, organ eller vev; disse midler refereres til som målmidler.

25 For midler som injiseres eller absorberes i kroppen og distribueres av blodet, er det ønskelig å ha en egnet blodhalveringstid. Selv om ekstremt lange halveringstider (dvs. dager eller uker) er unødvendig i kliniske avbildningssituasjoner og muligens farlige (grunnet økt sjans for toksisitet og metabolsk nedbrytning til pigmenterte toksiske molekyler), er heller ikke korte halveringstider ønskelig. Dersom avbildningsforbed-

ringen varer for kort, vil det være vanskelig å erverve en høykvalitetsavbildning av pasienten. Dessuten vil en rask klarer av et målemiddel redusere mengden av midlet som er tilgjengelig for å binde målstedet og følgelig redusere ”lyset” av målstedet på avbildningen.

5 Økningen av blodhalveringstid for et avbildningsmiddel innbefatter å forstyrre én eller flere av de følgende klaringsmekanismer:

a) Renal ekskresjon. Molekyler under 60000 dalton molekylærvækt, spesielt små molekyler, kan fjernes fra blodet ved ikke-spesifikk glomerular filtrasjon i nyrene. Dersom molekylerne utviser en viss grad av binding av plasmaproteiner eller andre konstituenten i blodet, vil kun den frie fraksjon være tilgjengelig for filtrasjon, og hastighet av renal ekskresjon vil bli tilsvarende redusert.

2) Hepatocellulært opptak. Dersom et molekyl besitter hydrofob karakter, vil en andel av komplekset tas opp av leverceller og skilles ut i gallen. Generelt gjelder at jo høyere grad av hydrofobisitet et molekyl besitter, jo høyere er hepatocyttopptakshastigheten. Selv om hydrofobisitet også fører til plasmaproteinbinding og en reduksjon i den tilsynelatende frie konsentrasjon av molekylet, kan den hepatocellulære opptakshastighet fortsatt være svært høy (D. Sorrentino et al., Prog. Liver Disease, pp. 203-204 (1990)), og således redusere blodhalveringstiden. Reduksjon i blodhalveringstid kan eller kan ikke ledsages av en økning i den totale hepatobiliære ekskresjon, dvs. andelen av den administrerte dose som endelig opptrer i fekaliene. Den sistnevnte mengde bestemmes av mange andre faktorer enn den hepatocellulære opptakshastighet, innbefattende omfanget av cytosolproteinbinding i hepatocytten, affinitet for kanalikulær (hepatocytt til galle) transportsystemer, effekter på gallestrøm og enterohepatisk resirkulasjon. Omfang av blodhalveringstid påvises ved blod eller plasmaprøver, ikke kun ved å måle reduksjon i den totale hepatobiliære ekskresjon. Lignende er ikke erholdelse og måling av signifikant plasmaproteinbinding av for et kontemplert kontrastmiddel tilstrekkelig for å vise at blodhalveringstiden er lengre grunnet lavere renal ekskresjon.

3) Reticuloendothelial (RE) eller andre systemer.

Store molekylvektsubstanser, så som liposomer, polymerer, proteiner og partikler, kan raskt klareres fra blodet ved gjenkjennelse (for eksempel opsonisering eller belegning med proteiner før det cellulære opptak) og opptak i celler, spesielt RE-celler i leveren (Kupfer-cellene), milt eller benmarg.

To generelle strategier har blitt rapportert for å øke blodhalveringstiden for kontrastmidler. En metode er å kovalent binde avbildningsmidlet via sterke eller metaboliserbare kjemiske bindinger til en høymolekylvektpolymer, protein, liposom eller partikler. For eksempel har gadoliniumdietyltri-amin-pentaeddiksyre (Gd-DTPA) blitt bundet til humant serumalbumin (HSA), poly-L-lysin eller dekstran (A. N. Oksendal et al., J. Magn. Reson. Imaging, 3 pp. 157-165 (1993); S. M. Rocklage, "Contrast Agents", Magnetic Resonance Imaging, Mosby Year Book, pp. 372-437 (1992)). Dette gjøres for å redusere den glomerulære filtrasjonshastighet i nyrene og tilbakeholde midlet i blodet. Imidlertid kan dette føre til en langsiktig tilbakeholdelse av midlet. Dessuten kan godt bundne avbildningsmidler potensielt frigi toksiske biprodukter så som frie metallioner i metabolismesteder for makromolekyler. Ytterligere kan store konjugater være vanskelig å sikte inn mot spesifikke steder kroppen. Den andre strategi har blitt anvendt på liposomer, polymerer, proteiner og partikler som vanligvis fjernes raskt fra sirkulasjon ved RE-systemet eller andre midler. Anordning av lange hydrofile polymerer som polyetylen glykol (PEG), på overflaten av substansen reduserer opptak ved RE eller andre systemer (C. Tilcock et al., Biochimica et Biophysica Acta, 1148, pp. 77-84 (1993); A.A. Bogdanoy et al., Radiology, 187, pp. 701-706 (1993)). Det er stilt opp den hypotese at store, sterkt hydrerte polymergrupper forstyrrer den molekylære prosess påkrevd for gjenkjennelse og opptak av substansene. Ulempene ved denne strategi innbefatter:

- a) høy kostnad og tungvinte produksjonsprosesser,
- b) tap av målevne for store konjugater og
- c) anvendelighet synes å være begrenset til høymolekyl vektssubstanser.

En spesiell utfordring er for innsiktede små molekyler som besitter noe lipofil karakter. Disse kan lide av raskt hepatocellulært opptak og blodklaring, hvilket muligens reduserer "lysheten" i målstedet. Dette er et spesielt problem når lipofilisitet er påkrevd for å erholde innsiktning til proteiner eller andre biologiske mål.

Et spesielt tilfelle av dette problem er utviklingen av småmolekyl-blodbane-midler. Nåværende småmolekylære ikke-spesifikke midler, så som Gd-DTPA for MRI, har relativt rask klaring fra blodet og er således ikke optimale for avbildning av blodkar (dvs. MR angiografi) eller for å overvåke blodstrøm til hjertet, hjernen, tumorer eller andre organer eller lesjoner. Lipofile midler som innsikter plasma-proteiner er kjent innen faget. Se US-Patent nr. 4.880.008 og 5.250.285. Selv om disse midler bindes til plasma-protein, spesielt til humant serumalbumin, kan de også underkastes raskt hepatocellulært opptak og redusert blodhalveringstid.

Det gjenstår et behov for kontrastmidler som holdes tilbake av blodet i en forlenget tidsperiode.

#### Oppsummering av beskrivelsen

5 Den foreliggende oppfinnelse tilveiebringer chelateringsligander som kan benyttes i diagnostiske avbildningskontrastmidler som utviser forbedret blodretensjon. De nye forbindelser omfatter de forbindelser som er angitt i krav 1 og som har

- a) en avbildningsfremmende (eller signalgenererende) gruppe (IEM),
- b) en plasmaproteinlignende gruppe (PPBM), og
- c) en blodhalveringstidsforlengende gruppe (BHEM).

10 Oppfinnelsen vedrører også diagnostiske sammensetninger inneholdende disse forbindelser og anvendelse av forbindelsene til fremstilling av diagnostiske sammensetninger for blodhalveringstidsforlengelse og kontrastforbedring ved diagnostisk avbildning.

Disse kontrastmidler utviser reduserte hastigheter både for renal og hepatocellulært opptak og ingen tilsynelatende opptak av RE-systemet. Midlene kan innsiktes til blod-  
15 "poolen" eller enhver annen biologisk komponent. Da midlet tapes mindre raskt fra blodstrømmen, kan lavere doseringer anvendes ved en høyere sikkerhetsmargin.

#### Detaljert beskrivelse av oppfinnelsen

For at oppfinnelsen heri beskrevet skal forstås mer fullstendig, er den følgende detaljerte beskrivelse gitt.

20 Benevnelsen "spesifikk affinitet" eller "molekylær affinitet" som anvendt heri, refererer til evnen kontrastmidlet har til å bli tatt opp av, holdt tilbake av eller bundet til en spesiell biologisk komponent i en vesentlig større grad enn andre komponenter. Kontrastmidler som har denne egenskap sies å være "innsiktet" til "mål"-komponenten.

Den foreliggende oppfinnelse vedrører ligander som fremmer kontrasten ved diagnos-  
25 tisk avbildning. Disse ligander kan gå inni forbindelser som omfatter:

- a) en avbildningsfremmende (eller signalgenererende)-gruppe (IEM),
- b) en plasmaproteinbindende gruppe (PPBM), og
- c) en blodhalveringstidsforlengende gruppe (BHEM).

Diagnostisk avbildning innbefatter, men er ikke begrenset til, MRI, røntgen, nukleær radiofarmasøytisk avbildning, ultrafiolett/synlig/infrarødt lys og ultralyd.

#### Avbildningsfremmende gruppe ("IEM")

Den første gruppe, IEM, kan være enhver kjemisk forbindelse eller substans som anvendes for å tilveiebringe signalet eller kontrasten ved avbildning.

Den signalfremmende gruppe kan være et organisk molekyl, metallion, salt eller chelat, partikler (spesielt jernpartikler) eller merket peptid, protein, polymer eller liposom.

En spesiell anvendelig IEM er en fysiologisk kompatibel metallchelatorforbindelse omfattende én eller flere sykliske eller asykliske organiske chelaterende midler kompleksert til én eller flere metallioner med atomnummer 21-29, 42, 44 eller 57-83.

For røntgenavbildning kan IEM'en omfatte en iodinerte organiske molekyler eller chelater av tungmetallioner med atomnummer 57-83. Eksempler på passende forbindelser er beskrevet i M. Sovak, et., "Radiocontrast Agents", Springer-Verlag, pp. 23-125 (1984) og US-Patent nr. 4.647.447.

For ultralydabildning består IEM av gassfylte bobler så som Albunex, Echovist eller Levovist, eller partikler eller metallchelater hvor metallionene har atomnummer 21-29, 42, 44 eller 57-83. Eksempler på passende forbindelser er beskrevet i Tyler et al., Ultrasonic Imaging, 3, pp. 323-29 (1981) og D.P. Swanson, "Enhancement Agents for Ultrasound": Fundamentals, "Farmaceuticals in Medical Imaging", pp. 682-87 (1990).

For nukleær radiofarmasøytisk avbildning eller radioterapi, omfatter IEM et radioaktivt molekyl. Mer foretrukket er chelater av Tc, Re, Co, Cu, Au, Ag, Pb, Bi, In og Ga. Enda mer foretrukket er chelater av Tc-99m. Eksempler på passende forbindelser er beskrevet i Rayudu GVS, Radiotracers for Medical Applications, I, pp. 201 og D.P. Swanson et al., ed., Pharmaceuticals in Medical Imaging, pp. 279-644 (1990).

For ultrafiolett/synlig/infrarødt lys avbildning omfatter IEM ethvert organisk eller uorganisk fargestoff eller ethvert metallchelater.

For MRI omfatter IEM et metall-ligand kompleks med en paramagnetisk form av et metallion med atomnummer 21-29, 42, 44 eller 57-83.

For å effektivt fremme en NMR-avbildning, må komplekset evne å fremme relaksasjonshastighetene  $1/T_1$  (longitudinal, eller spinn-gitter) og/eller  $1/T_2$  (transversal eller spin-spin) av vannprotoner eller annen avbildning eller spektroskopisk nukleid, innbefattende protoner, P-31, C-13, Na-23 eller F-19 og andre biomolekyler eller injiserte biomarkerere. Relaksiviteter  $R_1$  og  $R_2$  er som definert som evnen til henholdsvis å øke  $1/T_1$  eller  $1/T_2$  pr. mM metallion; enheter er  $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ . For den mest vanlige form av klinisk MRA, vannprotoner MRI, er relaksivitet optimal når den paramagnetiske ionebinding til den chelaterende ligand fortsatt har én eller flere åpne koordinasjonssteder for vannutbytting (R.B. Lauffer, Chemical Reviews, 87, pp. 901-927 (1987)). Imidlertid må dette være balansert med stabiliteten av metallchelatat (se nedenfor) som generelt synker med økende antall åpne koordinasjonssteder. Mer foretrukket inneholder komplekset følgelig kun én eller to åpne koordinasjonssteder.

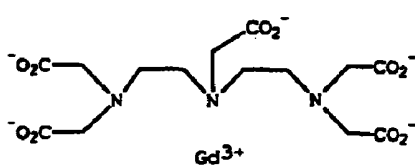
I tillegg til øke  $1/T_1$  eller  $1/T_2$  av vevsnukleid via dipol-dipol-interaksjoner, kan MRI-midler påvirke to andre magnetiske egenskaper og følgelig være klinisk anvendelige:

- 1) en jernpartikkel eller metallchelatat med høy magnetisk susceptibilitet, spesielle chelater av Dy, Gd eller Ho, kan endre MRI-signalintensiteten av det ved å skape mikroskopiske magnetiske susceptibilitetsgradienter (A. Villringer et al., Magn. Reson. Med. 6, pp. 164-174 (1988). Ingen åpne koordinasjonssteder på et chelat er påkrevd for denne applikasjon.
  - 2) en jernpartikkel eller metallchelatat kan også anvendes for å skifte resonansfrekvensen av vannprotoner eller annen avbildning- eller spektroskopisk nukleid, innbefattende protoner, P-13, C-13, Na-23 eller F-19 på andre biomolekyler eller injiserte biomarkerere. Her kan, avhengig av nukleusen og anvendt strategi, null til tre åpne koordinasjonssteder anvendes.
- Det foretrukne paramagnetiske metall velges fra gruppen omfattende Gd(III), Fe(III), Nm(II og III), Cr(III), Cu(II), Dy(III), Tb(III), Ho(III), Er(III) og Eu(III). Den mest foretrukne er Gd(III).

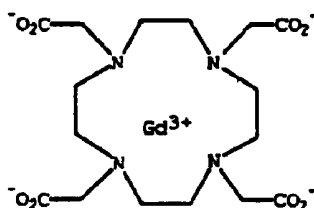
Selv om det paramagnetiske metall anvendes i en kompleksert form, kan toksiske effekter fortsatt oppstå grunnet dissosiasjon av metallionet fra komplekset. Den organisk chelaterende ligand bør være fysiologisk kompatibel. Molekylstørrelsen av den chelaterende ligand bør være kompatibel med størrelsen på det paramagnetiske metall. Således krever gadolinium (III), som har en krystallionradius på  $0,938 \times 10^{-10}$  m (0,938 Å), en

større chelaterende ligand enn jern (III), som har en krystallioneradius på  $0,64 \times 10^{-10}$  m (0,64 Å).

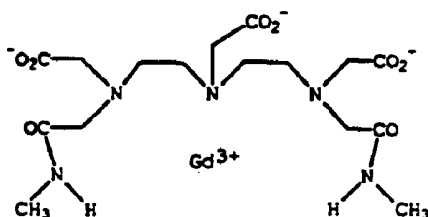
- Generelt er grad av toksisitet av et metallchelate relatert til dets grad av dissosiasjon *in vivo* før ekskresjon. Toksisitet øker generelt med mengden av fritt metallion. For
- 5 komplekser hvori kinetisk stabilitet er lav, er en høy termodynamisk stabilitet (en dannelseskonstant på minst  $10^{15} \text{ M}^{-1}$ ) opphøyd og mer foretrukket ( $-10^{-20} \text{ M}^{-1}$ ) ønskelig for å minimere dissosiasjon og dets ledsagende toksisitet. For komplekser hvori kinetisk stabilitet er høyere i forhold, vil dissosiasjon kunne minimeres med lavere dannelseskonstant, dvs.  $10^{10} \text{ M}^{-1}$  eller høyere.
- 10 Toksisitet er også en funksjon av antall åpne koordinasjonssteder i komplekset. Jo færre koordinasjonssteder, jo mindre er generelt tendensen for at det chelaterende middel skal frigi den paramagnetiske substans. Fortrinnsvis inneholder komplekset følgende to, én eller null åpne koordinasjonssteder. Tilstedeværelsen av mer enn to åpningssteder vil generelt øke toksisitet på en uakseptabel måte ved å frigi metallionet *in vivo*.
- 15 Mange passende chelaterende ligander for MRI-midler er kjent innen faget. Disse kan også anvendes for metall-chelater for andre former for biologisk avbildning. For MRI-avbildning innbefatter de foretrukne IEM'er:



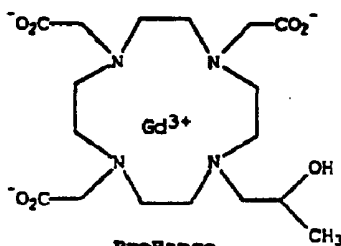
**Magnevist**  
gadopentetat dimeglumin  
DTPA



**Dotarem**  
gadoterat meglumin  
DOTA



**Omniscan**  
gadodiamid  
DTPA-BMA



**ProHance**  
gadoteridol  
HP-DO3A



### Plasma proteinbindende gruppe ("PPBM")

Den andre komponent av kontrastmidlene er en PPBM. Denne forbindelsen binder kontrastmidlet til plasmaproteiner og reduserer hastigheten av renal ekskresjon.

Plasmaproteiner av interesse innbefatter albumin, spesielt human serumalbumin (HSA), som binder molekyler som utviser noen lipofile andeler og enten negative ladninger ved fysiologisk pH eller delvis negativt ladende oksygener eller svovelatomer eller fluoratomer; alfasyreglykoprotein, som primært binder positivt ladde molekyler; globuliner, som binder steroidale molekyler; og lipoproteiner som binder lipofile eller fettsyretypemolekyler. PPBM-en må derfor velges riktig for å oppnå binding til det passende protein. Da HSA foreligger ved den høyeste konsentrasjon i serum og har høy affinitet og kapasitet for binding av en rekke molekyler, er det foretrukne plasmaprotein for anvendelse for å øke blodhalveringstid. HSA er også det foretrukne plasmaproteinmål da det binder til negativt ladde molekyler som har en tendens til å bli mindre toksiske enn positivt ladde molekyler.

For binding til HSA, kan en rekke hydrofobe eller amfifile substanser være anvendelige som PPBM (U. Kragh-Hansen, Pharm. Rev., 33, pp. 17-53 (1981); X.M. He et al., Nature, 358, pp. 209-215 (1992); D.C. Carter, Adv. Protein Chem., 45, pp. 153-203 (1994)). Disse innbefatter, men er ikke begrenset til alifatiske eller arylgrupper med 1 til 60 karboner samt ethvert antall nitrogener, oksygener, svovler, halogener, alkylgrupper, amider, estere og sulfonamidsubstituent. Alternativt kan PPBM være et peptid inneholdende hydrofobe aminosyreresiduer og/eller substituent med eller uten hydrofobe eller hydrofile terminasjonsgrupper. For å erholde 10 % binding i plasma, har det foretrukne PPBM minst 7 karbonatomer, mer foretrukket 13 og mest foretrukket 18 karbonatomer.

Som hevdet over, kan en rekke hydrofobe substanser være anvendelige som PPBM ved binding til HSA. Generelt vil bindingsaffinitet til HSA og muligens andre proteiner øke mer PPBM'ens hydrofobisitet. Teoretiske estimater av hydrofobisitet av en substituent så som en PPBM kan erholdes ved å beregne bidraget til logaritmen for oktanolvann (eller oktanolbuffer) partisjonskoeffisienten ( $\log P$ ) for selve PPBM'en ved anvendelse av Hansch  $\pi$ -konstant for substituent. Se A. Leo and C. Hansch, "Partition Coefficients and their Uses", Chemical Reviews, 71, pp. 525-616 (1971); K.C. Chu, "The Quantitative Analysis of Structure-Activity Relationships", Burger's Medicinal Chemistry, Part 1, pp. 393-418, (4th ed. 1980). Bindingsaffinitet vil øke med økende  $\log P$ .

bidrag. For eksempel kan de følgende konstanter anvendes for substituenten på alifatiske grupper:

	<u>Gruppe</u>	<u>n-alifatisk</u>
	CH <sub>3</sub>	0,50
5	Fenyl	2,15

For substituenten på arylgrupper kan de følgende  $\pi$ -konstanter anvendes:

	<u>Gruppe</u>	<u>n-alifatisk</u>
	CH <sub>3</sub>	0,56
	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	1,02
10	Fenyl	1,96

Følgelig vil logg P-bidraget for en p-metylbenzylgruppe bundet til en IEM beregnes som følger (ved anvendelse av verdien for den  $\pi$ -alifatiske CH<sub>3</sub> som et estimat for -CH<sub>2</sub>-gruppen):

$$\text{logg P bidrag} = 0,50 + 2,15 + 0,56 = 3,21$$

- 15 Ved binding til HSA, er et minimum logg P på 2 (ekvivalent 4 CH<sub>3</sub>-grupper eller fenylring) påkrevd for å erholde signifikant binding. Mer foretrukket er et logg P bidrag på 3. Sågar mer foretrukket er et logg P-bidrag på 4.

HSA-binding kan evalueres ved likevektsdialyse eller ultrafiltrasjon ved anvendelse av 4,5 % vekt/volum HSA i en pH 7,4-buffer. Fortrinnsvis minst 10 %, mer foretrukket minst 50 %, mer foretrukket minst 80 % og mest foretrukket minst 95 % kontrastmiddel er bundet til HSA ved en fysiologisk relevant konsentrasjon (0,01-10mM i plasma for MRI, røntgen, lys og ultralys; > 1 uM for radiofarmasøytika). I denne applikasjon har målingen av prosentbind av kontrastmidlet til HSA et feilestimat på om lag +/-5 %. Proteinbinding til andre proteiner eller til serum kan evalueres på lignende måte.

- 25 De tilsatte lipofile grupper i kontrastmidlet vil sannsynligvis redusere løseligheten av midlet. For å opprettholde effektiv løselighet av kontrastmidlet ved klinisk effektive doseringsnivåer eller høyere, kan det være foretrukket å inkorporere en eller flere hydrogenbindingsgrupper (oksygen, nitrogener, etc.) i PPBM'en.

30 Selv om rent alifatiske grupper kan anvendes som PPBM'er, kan det være at disse ikke er så foretrukne som blandede alifatiske arylgrupper eller rene arylgrupper. Spesielt når

en negativ ladning er bundet til en ren alifatisk gruppe, spesielt lange og fleksible, kan kontrastmidlet forstyrre metabolismen av endogene molekyler så som fettsyrer eller interaksjoner mellom membranproteiner og lipider. Dette kan øke toksisitet av midlet. Følgelig er det foretrukket at PPBM'en inneholder minst en arylring.

- 5 I det tilfellet at HSA-bundet MRI-midler for blodbanemidler, tumor eller vevsforbedring, er det spesielt foretrukket at kontrastmidler inneholder to eller flere distinkte lipofile grupper for fullstendig å immobilisere midlene når de er bundet til proteiner. Disse grupper kan være på en PPBM, eller som to eller flere separate kjemiske grupper bundet til kontrastmidlet. På grunn av deres store natur og rigiditet, er det fordelaktig at  
10 to eller flere grupper hver består av en aromatisk ring, med de to eller flere ringene i hele molekylet anordnet i en rigid, ikke-plan orientering.

Den magnetiske effektivitet, eller relaksivitet, av et MRI-middel er generelt høyest når midlet har en rotasjonell korrelasjonstid om lag lik HSA (R.B. Lauffer, Chemical Reviews, 87, pp.901-927 (1987)). Selv om et lite molekyl så som Gd-DTPA har en rotasjonell korrelasjonstid på om lag 0,1 (ns), har HSA en korrelasjonstid på mer enn 5-10  
15 ns; dersom et chelat har såpass lenger korrelasjonstid, inntreffer magnetiske fluktasjoner mellom det paramagnetiske ion og vannprotoner på samme tidsskala som Larmorfrekvensen, hvilket genererer den mest effektive longitudinale ( $T_1$ ) relaksasjon og således den høyest mulige relaksivitet. Enhver fleksibilitet av chelatet når det er bundet til  
20 proteinet, er forventet å minske den effektive rotasjonelle korrelasjonstid og således redusere relaksivitet. Da et sete for binding til proteinet fortsatt kan gi fleksibilitet i flere retninger, kan ytterligere bindingssteder være foretrukket.

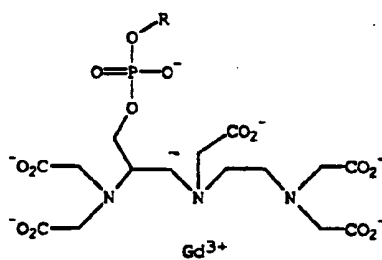
Graden hvorved et middel har blitt avstemt for maksimal relaksivitet, kan evalueres ved å måle relaksivitetbundet ( $R_1$ -bundet) i nærvær av HSA. Dette fordrer måling av relaksivitet av det frie chelat ( $R_1$ -fri) samt relaksivitet ( $R_1$ -observert) og prosentbinding av  
25 middel i 4,5 % HSA.  $R_1$ -observert er en molfraksjon veid midlere av  $R_1$ -fri og  $R_1$ -bundet:

$$R_1\text{-observert} = (\text{fraksjonsfri} * R_1\text{-fri}) + (\text{fraksjonsbundet} * R_1\text{-bundet})$$

Selv om:

30 
$$R_1\text{-bundet} = \frac{R_1\text{-observert} - (\text{fraksjonsfri} * R_1\text{-fri})}{\text{fraksjonsbundet}}$$

Fordelen med å ha to eller flere arylringer holdt på en rigid, ikke-planar måte kan ses i den følgende tabell som viser relaksivitet-bundne verdier for MS-322 ( $56 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) og MS-325 ( $42 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) versus MS-317 ( $34 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ ). Bifenyl- eller bifenylgruppene i MS-322 og MS-325 synes å begrense mobilitet av det HSA-bundne kontrastmiddel. I denne applikasjon er feilen assosiert med målverdier av relaksivitetsbundne verdier om lag +/- 5 %.



	R	$R_1$ -bundet $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$
MS-317		34
MS-322		56
MS-325		42

Som det kan ses fra tabellen over, hadde forbindelsene med to ringer rigidholdt i en ikke-planar orientering, høyere relaksivitetsbundne verdier.

Som det kan ses i ligningene over, kan den faktiske  $R_1$ -observerte økes ved å øke den fraksjonsbundne, dvs. øke bindingsaffiniteten for midlet HSA. Det kan også medføre lavere renal ekskresjon og lenger blodhalveringstid og er følgelig synergistisk. Likevel er det viktig å maksimere styrke av midlet ved å maksimere  $R_1$ -bundet for å anvende den laveste dose og den høyeste sikkerhetsmargin.

#### Blodhalveringstidsforlengende gruppe ("BHEM")

Tredje gruppe kontrastmidler, BHEM'ene, reduserer hastighet av hepatocyttopptak av

kontrastmidlet. Balansen mellom hydrofilisitet og lipofilisitet og den eksakte molekylære struktur av molekylet bestemmer dets hepatocyttopptakshastighet.

I kontrastmidlene reduserer eller eliminerer BHEM hepatocyttopptak uten å urimelig gripe inn i effektivitet av PPBM. BHEM er ekstremt hydrofile grupper som kan hydrogenbinde med vann. Nærvær av et kontrastmiddel av den hydrofile BHEM reduserer hepatocyttopptak av midlet.

Eksempler på kjemiske grupper som kan tjene som en BHEM innbefatter karbon, fosfor, vanadium, molybden eller svovelatomer med bundne, lagde eller nøytrale heteroatomer så som oksygen, nitrogen, svovel eller halogener (spesielt fluor) som besitter to eller tre eller mer elektronpar (dvs. fullt eller delvis negativt ladd) eller elektropositive hydrogenatomer (dvs. protonert amin) for hydrogenbinding med vann. Disse innbefatter grupper så som sulfon, eter, urea, tio-urea, aminfulsonamid, karbamat, peptid, ester, karbonat og acetaler. Foretrukne grupper innbefatter de som besitter en eller flere delvis eller selvstendig negative ladninger i vandige løsninger i fysiologisk pH hvori de negativt ladde atomer ikke kan være delvis eller fullstendig nøytralisert kovalente eller koordinat kovalent binding til IEM. Eksempler på disse foretrukne BHEM'er innbefatter negativt ladde grupper så som fosfat-noester, fosfatdiester, karboksylat og sulfonat. Mer foretrukne er de som har fosfatgrupper eller enhver esterform derav. Enda mer foretrukne er fosfatdiestere da:

- a) de er svært hydrofile med fire hydrogenbindingsoksygener,
- b) de er relativt enkelt syntetiserbare ved anvendelse av teknikker vist under,
- c) de tjener som utmerkede linkere mellom IEM'en og PPBM'en, og
- d) fordi fosfatforbindelser eksisterer og er metabolisert naturlig i kroppen, fosfat diesterinneholdende kontrastmidler er forventet å være ikke-toksiske.

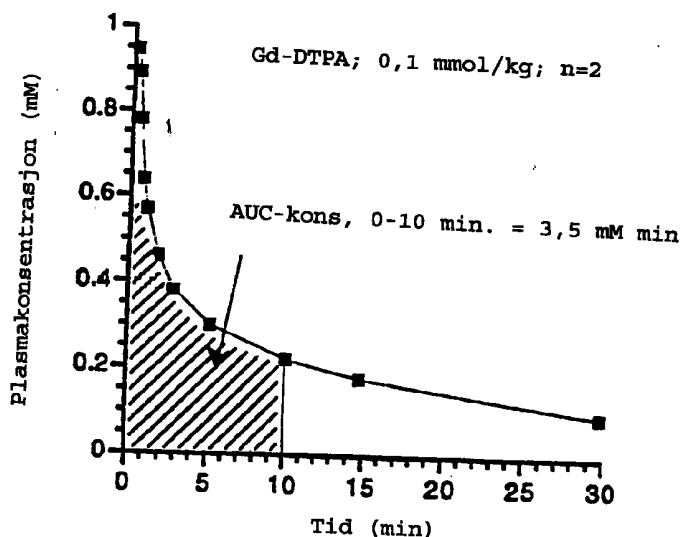
Alle av de ovenfor nevnte grupper kan på sin side festes til en linkergruppe som knytter dem enten til IEM'en, PPBM'en eller begge. En linkergruppe er enhver fysiologisk kompatibel kjemisk gruppe som ikke forstyrrer funksjonene av IEM, PPBM eller BHEM. Foretrukne linkere er syntetisk lette å inkorporere i kontrastmidlet. De er heller ikke så urimelig store at de manifesterer sine egne uønskede biologiske funksjoner eller innsiktningspåvirkning i kontrastmidlet. Fortrinnsvis er lengden av linkeren i området 1 - 50 Ångstrøm, mer foretrukket 1 - 10 Ångstrøm.

Inkorporering til et kontrastmiddel av en BHEM resulterer i forlenget blodretensjon av midlet. Blodretensjon er fortrinnsvis målt i et rat-plasma farmakokinetisk eksperiment

ved å beregnet arealet under plasmakonsentrasjoner mot tidskurven ("Areal under kurven" eller "AUC-kons.") for en spesifikk tidsperiode (for eksempel 0 - 10 minutter, 0 - 30 minutter, 0 - 60 minutter, 0 - 120 minutter eller 0 - uendelig). Blodretensjon (som målt ved AUC-kons.) kan evalueres eksperimentelt ved administrasjon av et kontrastmiddel til rotter, kaniner eller høyere pattedyr. Det har blitt observert at blodhalveringsekstensjon er større i kaniner og høyere pattedyr enn i rotter. I denne applikasjon representerer blodhalveringsdata gitt ved AUC-kons. eksperimenter i rotter. Feil i disse data er estimert til å være om lag +/- 10 %.

Årsaken til at selve halveringstidsmålingen ikke anvendes er at den matematiske definisjon av denne mengde ofte ikke er klar, og de resulterende estimater er varierende avhengig av den anvendte farmakokinetiske modell og tidsperioden blodprøvene ble erholdt.

For eksempel er midlere plasmakonsentrasjoner observert etter haleveinjeksjon av 0,1 mmol/kg Gd<sup>153</sup>-merket Gd-DTPA i to rotter vist under. Ved anvendelse av Macintosh-programmet KaleidaGraph ble denne AUC-kons. Fra 0 til 10 min. beregnet som 3,5 mM min.



Kontrastmidlene ifølge oppfinnelsen utviser en AUC-kons. Økning på minst 20 % når BHEM settes til IEM'en og PPBM'en. De utviser fortrinnsvis en AUC-konsentrasjonsøkning på minst 40 %, mer foretrukket minst 70 % og mest foretrukket minst 100 %.

Generelt er denne økning i AUC-konsentrasjoner forårsaket av en BHEM som er større

når bindingen i plasmaet i bindingen er signifikant, for eksempel 20 - 50 % større. Den kalkulerede prosentøkning i AUC-konsentrasjonen kan være ulik for AUC-konsentrasjoner bestemt over ulike tidsperioder. Generelt er prosentøkning i AUC-konsentrasjon forårsaket av en BHEM større for AUC-konsentrasjoner tatt over en lengre periode, for eksempel 0 - 30 minutter snarere enn 0 - 10 minutter.

Da strukturen og de fysiske karakteristikkene av hele kontrastmiddelmolekylet vil styre dets binding i plasma, er det viktig å velge IEM'er og BHEM'er som er kompatible med den ønskede binding. For eksempel er det for å oppnå binding til de positivt ladede bindingssteder HSA, foretrukket å ha IEM'er og BHEM'er på nettonøytral eller nettonegativ ladning for å redusere mulighet for repulsjon og eventuelt sågar økning i bindingsaffinitet. For binding til alfasyreglykoprotein bør minst en andel av kontrastmidlet være positivt ladd. For binding til globuliner bør minst en andel av kontrastmidlet være steroidalt av natur. For binding til lipoproteiner bør minst en andel av kontrastmidlet være lipofilt eller fettsyrelignende.

Kontrastmidlene med chelateringsligander ifølge oppfinnelsen kan kategoriseres i tre grupper:

1) Blodbanemidler

Når bindingsaffinitet i plasmaproteiner er høy (dvs. høyere enn 50 % bundet, eller mer foretrukket større enn 80 % bundet eller mer foretrukket større enn 95 % bundet), har midlene en tendens til å vise primært blodbanemidler. Selv om midlene har tilgang på det interstitiale rom (ekstracellulære rom mellom celler) utenfor blodkapillærene, er generelt konsentrasjonen for relevante plasmaproteiner så som HSA lavere i dette rom sammenlignet med plasma.

Følgelig er plasmakonsentrasjon av midlene høyere enn den interstitiale konsentrasjon, og følgelig forbedres strukturer i kroppen som blodkar eller vev inneholdende en stor mengde blodkar mer enn strukturer med lavt blodinnhold. Applikasjoner for denne type midler innbefatter angiografi (avbildning av blodkar), perfusjon (bestemmelse av hastighet av blodstrømning inn i et vev eller tumor ved anvendelse av rapid avbildning) og blodvolumbestemmelser (for eksempel for å skille maligne tumorer med god blodtilførsel fra blodartede tumorer med lavt blodvolum).

## 2) Vevs- eller tumorfremmende midler

I noen tilfeller er det ønskelig å la kontrastmidlene få rask tilgang til det interstitiale rom og bindes til plasmaproteiner deri. For eksempel kan det i MRI være ønskelig å få høyest mulig forbedring fra et vev eller tumor så snart som mulig etter injeksjon. Siden proteinbundne MRI-midler gir større forbedring enn frie midler, vil det beste midlet være et som kan entre det interstitiale rom og bindes til proteinene. Imidlertid vil dets overføringshastighet over kapillærene (bestemt fra den frie konsentrasjon) være for langsom dersom midlet er godt bundet i plasma, for eksempler mer enn 90 % bundet, og svært lite av midlet kommer inn i det interstitiale rom og produserer signalforbedring av vev. Likeledes vil midlet ved kun 10 % binding være fritt til å endre det interstitiale rom, men har liten signalforbedrende evne. Følgelig er det påkrevd med en passende balanse mellom overføringshastighet og bindingsaffinitet. For disse applikasjoner bør bindingen av midlene i plasmaet være større enn 10 % og mindre enn 95 %, eller fortrinnsvis større enn 50 %, men mindre enn 95 %.

Denne tilnæringsmåte er spesielt anvendelig ved tumoravbildning med MRI. Maligne tumorer har ofte bedre blodstrøm enn benigne tumorer, følgelig kan rapid avbildning av tumor (og interstitielt) opptak ofte skille disse tumortyper.

Imidlertid trenger man ved klinisk applikasjon den største signalforskjell mellom de to vevene for å gi tydeligere diskriminasjon. Signalforbedringen via proteinbinding vil hjelpe i denne sammenheng. Ytterligere lekker de nye raskt voksende kapillærene i maligne tumorer, hvilket gir en høyere konsentrasjon av plasmaproteiner i det interstitiale rom av disse tumorer. Dette kan medføre større signalforbedring i de maligne tumorer sammenlignet med benigne tumorer med mindre lekkede kapillærer.

## 3. Innsiktede midler

Når midlet er innsiktet mot et spesifikt vev eller lesjon i kroppen, gjelder en logikk som ligner den beskrevet i de to avsnittene over. De relative affiniteter av midlet for plasmaproteiner og målsetet behøver ikke å være balansert slik at midlet har noen tilgang for å binde seg til målet og samtidig ha noen binding til plasmaproteiner for å øke blodhalveringstid. For innsiktede applikasjoner bør bindingen av midlene i plasmaet være større enn 10 % og mindre enn 95 % eller fortrinnsvis større enn 50 % og mindre enn 95 %. Innsiktningsgruppe kan være en lipofil substans, reseptorligand, antistoff eller annet bimolekyl som er kjent for å konsentreres i den spesifikke biologiske komponent en ønsker å avbilde.



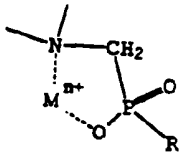
### Strukturell anordning

Det er tilrettelagt for at de tre gruppene av kontrastmidler kan anordnes i en rekke posisjoner med hensyn til hverandre. Imidlertid kan ikke anordningen av gruppene være slik at en gruppe forstyrrer men enn den tiltenkte funksjon av den andre. For eksempel bør i et HSA-bindende kontrastmiddel ikke en anordning av BHEM blokkere evnen PPBM har til å binde midlet til HSA. Da de viktigste bindingssteder i HSA er sokkeliggende (X.M. He et al., Nature, 358, pp. 209-215 (1992); D.C. Carter, Adv. Protein Chem., 45, pp. 153 - 203 (1994)), med hydrofobe indre (spesielt nær "tåen"-regionen) og positivt ladde "ankel"-regioner, vil bindingsaffiniteten for en PPBM reduseres dersom den distale andel av PPBM'en ble gjort ekstremt hydrofil. Som et illustrerende eksempel, er den mest foretrukne BHEM-posisjon på ringen orto, etterfulgt av meta dersom PPBM er en fenylring. En hydrofil gruppe i paraposisjon vil redusere PPBM'ens bindingssaffinitet for HSA.

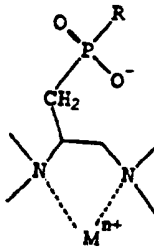
For IEM'er som omfatter et metallchelate er det foretrukket at BHEM'ene og PPBM'ene ikke festes til IEM slik at bindingsstyrken mellom metallionet og den chelaterende ligand signifikant kan reduseres. For eksempel er det når den chelaterende arm er acetat, foretrukket at BHEM eller PPBM'en ikke er forbundet til acetatoksygenet.

Et annen posisjonelt krav er at BHEM'enes negative ladde atomer ikke kan være delvis eller fullstendig nøytralisert ved kovalent eller koordinat-kovalente bindinger til IEM, dette sikrer at de svært hydrofile atomene IEM vil være svært oppløst i vandige systemer. For eksempel er det når IEM er et metallchelate viktig å posisjonere de negativt ladde atomer i BHEM slik at de ikke kan bli nøytralisert ved det positivt ladde metallion ( $M^{n+}$ ) i IEM'en ved koordinat kovalent binding via dannelsen av 5- eller 6-ledede chelatringer, de mest stabile ringstørrelser. Siden 5-ledede chelatringer er de mest stabile for det interessante metallionet for IEM (så som gadolinium), er det svært viktig å forhindre deres dannelse. Således, som vist i tegningen under, kan ikke en fosfinat ( $-PO_2$ ) eller fosfonat ( $-PO_3^-$ ) BHEM ikke være bundet til nitrogenatomet i et aminokarboksy-latchelaterende middel via en  $-CH_2$ -linker da denne vil danne en svært stabil 5-ledet chelatring. Lignende bør ikke en fosfordiester ( $-OPO_3$ )BHEM være bundet til nitrogenatomet i et aminokarboksy-latchelaterende middel via en  $-CH_2$ -linker da dette kan danne en 6-ledet chelatering.

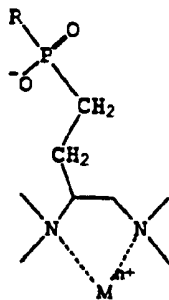
Imidlertid kan begge disse BHEM'er være bundet til andre posisjoner så som metylenryggmargen i liganden. I noen tilfeller, som vist, kan det være foretrukket å øke lengden av linkergruppen for å sikre at 5- eller 6-ledede ringer ikke dannes.

Fosfinat-BHEM

Svært ugunstig  
(5-leddete chelatering,  
nøytralisert ladning)

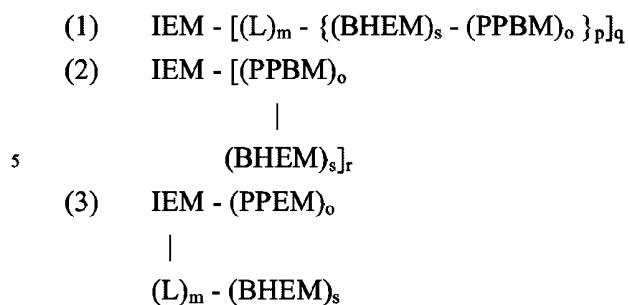


Ugunstig  
(6-leddete chelatering,  
nøytralisert ladning)



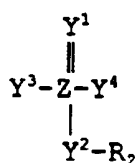
Mer foretrukket  
(ingen mulighet for 5- eller  
6-leddete chelateringer eller  
ladningsnøytralisering)

Det er tilrettelagt for at gruppene kan posisjoneres i kontrastmidler slik at det resulterer i de følgende strukturer:



- hvori IEM er en avbildningsfremmende gruppe,  
 10 L er en linkergruppe,  
 BHEM er en blodhalveringsforlengende gruppe,  
 PPBM er en plasmaproteinbinding,  
 m kan være lik 0 - 4,  
 s, o og p kan være like eller ulike og lik 1 - 4,  
 15 og r og q er minst en.

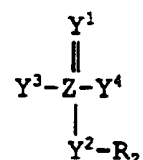
Dersom gruppen er posisjonert i kontrastmidler så som i struktur (1) over, er BHEM  
 fortrinnsvis sulfon, urea, tio-urea, amin, sulfonamid, karbamat, peptid, ester, karbonat,  
 acetaler og mer foretrukket



- eller esterformer  
 20 hvori Z = P, W, Mo eller S,  
 Y<sup>1</sup>, Y<sup>2</sup> = O eller S  
 Y<sup>3</sup>, Y<sup>4</sup> = O, S eller ikke foreligger  
 R<sub>2</sub> = H, C<sub>1-6</sub> alkyl eller ikke foreligger.

Mest foretrukket er BHEM en fosfatgruppe.

Dersom gruppene er posisjonert i kontrastmidlet som i struktur (2) over, er BHEM fortrinnsvis sulfon, urea, tio-urea, amin, sulfonamid, karbamat, peptid, ester, karbonat, acetal og mer foretrukket har BHEM den følgende formel:

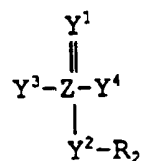


eller esterformer

- 5 hvori Z = P, W eller Mo  
 $Y^1, Y^2 = O$  eller S  
 $Y^3, Y^4 = O, S$  eller ikke foreligger  
 $R_2 = H, C_{1-6}$ -alkyl eller ikke foreligger

Mest foretrukket er BHEM en fosfatgruppe.

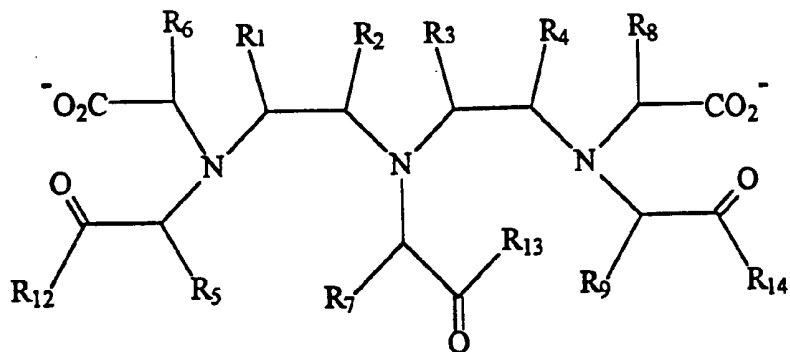
- 10 Dersom gruppene er posisjonert i kontrastmidlet som i struktur (3) over, er BHEM fortrinnsvis  $SO_3$ - eller esterformer, sulfon, urea, tio-urea, amin, sulfonamid, karbamat, peptid, ester, karbonat, acetal og mer foretrukket



- 15 eller esterformer  
 hvori Z = P, W, Mo eller S,  
 $Y^1, Y^2 = O$  eller S  
 $Y^3, Y^4 = O, S$  eller ikke foreligger  
 $R_2 = H, C_{1-6}$ -alkyl eller ikke foreligger

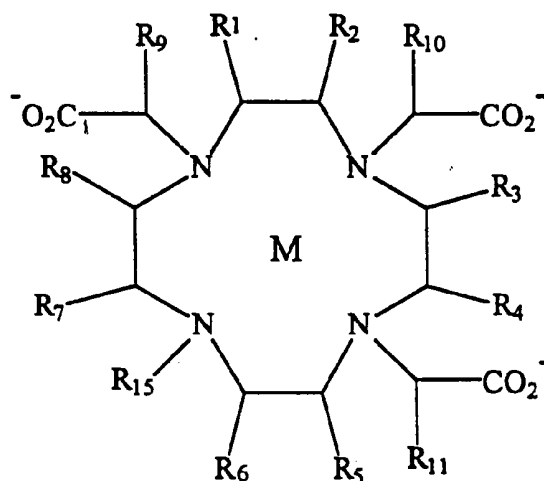
- 20 Mest foretrukket er BHEM en fosfatgruppe.

Det er tilrettelagt for at dersom gruppene er posisjonert i kontrastmidlet som vist i struktur (3) over, har de foretrukne kontrastmidler formlene:



M

eller



M

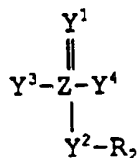
hvor M er et metallion med et atomnummer 21 - 29, 42, 44 eller 57 - 83,

hvor  $R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9, R_{10}, R_{11}$  og  $R_{16}$  kan være like eller ulike og valgt fra gruppen omfattende H, PPBM, BHEM og  $C_{1-6}$  alkyl, forutsatt at minst en av disse er PPBM og minst en annen er BHEM,

5  $R_{12}, R_{13}$  og  $R_{14}$  kan være like eller ulike og valgt fra gruppen omfattende  $O^-$  og  $N(H)R_{17}$ ,

$R_{15} = H$  eller  $C_{1-6}$  alkyl.

For kontrastmidler omfattende formlene gitt over er metallionet M mer foretrukket Gd(III), Fe(III), Mn(II), Mn(III), Cr(III), Cu(II), Dy(III), Tb(III), Ho(III), Er(III) eller  
 10 Eu(III), og mest foretrukket Gd(III). BHEM er fortrinnsvis sulfon, eter, urea, tio-urea, amin, amid, sulfonamid, karbamat, peptid, ester, karbonat, acetal og mer foretrukket  $COO^-$  eller esterformer,  $SO_3^-$  eller esterformer og



eller esterformer

hvor  $Z = \text{P}, \text{W}, \text{Mo}$  eller  $\text{S}$ ,

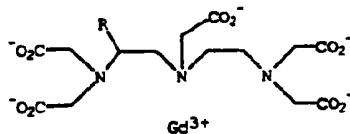
$\text{Y}^1, \text{Y}^2 = \text{O}$  eller  $\text{S}$

$\text{Y}^3, \text{Y}^4 = \text{O}, \text{S}$  eller ikke foreligger

5  $\text{R}_2 = \text{H}, \text{C}_{1-6}$ -alkyl eller ikke foreligger

I det tilfellet av et HSA-bindende kontrastmiddel kan BHEM være plassert mellom IEM og PPBM som vist over i struktur (I) eller på IEM vekk fra PPBM som vist over struktur (3). På dette vis kan det fullstendige bindingspotensial av den hydrofobe PPBM-gruppe uttrykkes uten å forstyrre den hydrofile BHEM-gruppe.

- 10 De følgende to eksempelpar tjener for å vise fordelene ved en fosfat BHEM innsatt mellom IEM Gd-DTPA og to ulike PPBM'er, en oktyl  $\text{C}_8$ -alifatgruppe og en naftylmetylgruppe. Rotter ble injisert intravenøst (halevene) med 0,1 mmol/kg av  $\text{Gd}^{153}$  radio-merkede komplekser. Plasmakonsentrasjoner ble bestemt over 30 minutter og tilpasset en standard bieksponensiell toromsmodell.
- 15 Resultatene for eliminasjonshalveringstid er gitt som arealet under plasmakonsentrasjonen på tidskurven (AUC-kons.) for de første 10 minutter. Ytterligere ble  $1/T_1\text{S}$  for plasmaprøvene notert (ved 20 MHz, 37 °C) for å evaluere effektivitet som MRI-midler. Disse verdier ble uttrykt som areal under  $1/T_1$  tidskurve (AUC- $1/T_1$ ) for de første 10 minutter.



Forb.	R	% bundet til HSA	t 1/2, min	AUC-kons mM * min	AUC-1/T <sub>1</sub> s <sup>-1</sup> * min
DTPA	H	0	15,0	3,5	27
MS-301	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> -	44	6,2	2,7	59
MS-315		56	14,0	3,4	87
MS-310		30	6,8	1,8	29
MS-321		40	14,0	3,2	54

Som vist i tabellen over økte tilsatsen av et fosfat BHEM til MS-301 og MS-310 (resulterende i henholdsvis MS-315 og MS-321) blodhalveringstiden for kontrastmidlet (som målt ved AUC-kons.) ved henholdsvis 26 % og 78 %.

IEM Gd-DTPA er relativt hydrofil og utviser lite eller ingen binding til HSA. Følgelig er dets relaksivitet i plasma ikke optimal og dets evne til å endre 1/T<sub>1</sub> (og blodsinal på MRI) over tid begrenset (se den relativt lave AUC-1/T<sub>1</sub>-verdi). Dette er til tross for dets relative lange blodhalveringstid på 15 minutter.

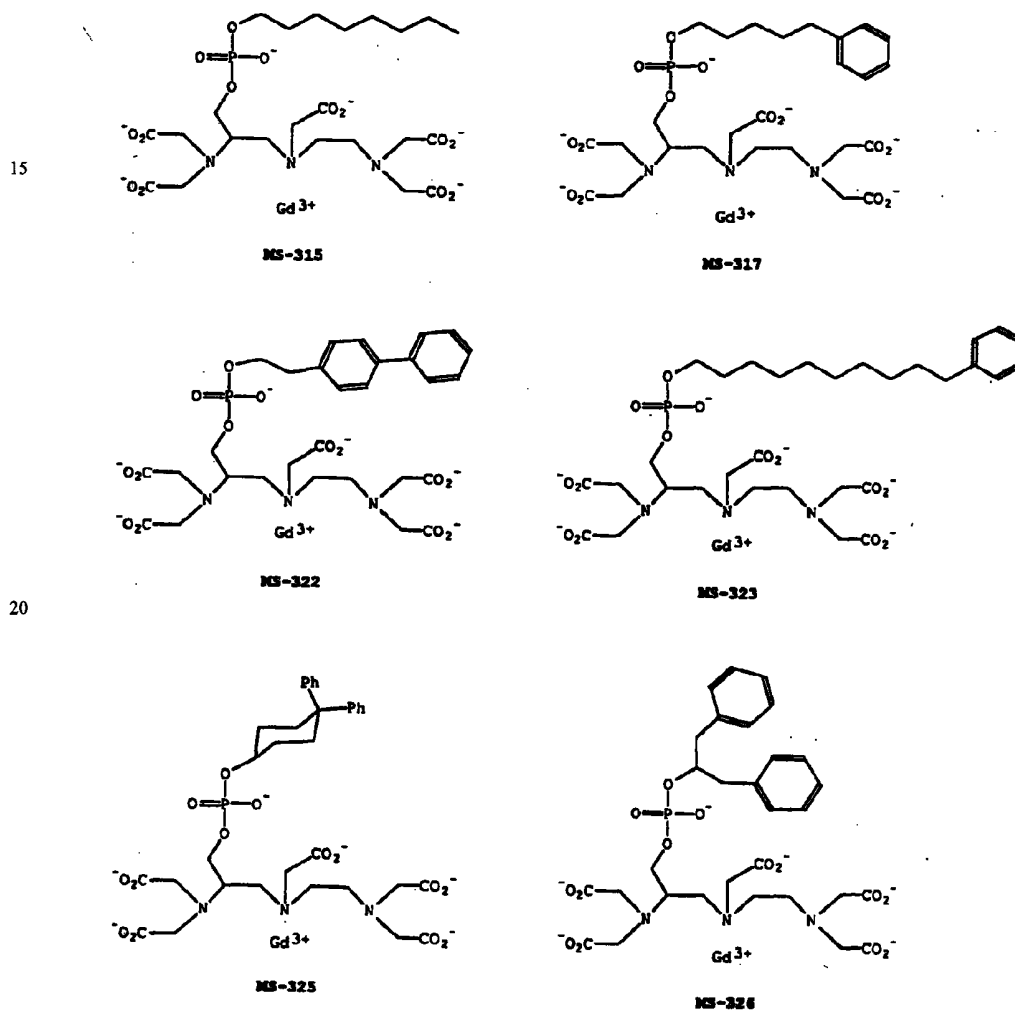
For å bedre HSA-bindingen og relaksiviteten, kan en C<sub>8</sub>-oktylgruppe plasseres i posisjon 1 på DTPA-stammen. Selv om dette bibringer HSA-bindingschelate og noen forbedringer i blodsinalet, medfører den lipofile gruppe alene en svært forkortet plasmahalveringstid. Innsettingen av den fosfatbaserte BHEM forbedrer faktisk HSA-binding og gjenoppretter plasmahalveringstid til en verdi nær Gd-DTPA. Som et resultat av dette, forbedres blodsinalet vesentlig.

Den passende plassering av BHEM i disse eksempler viser viktigheten av dette aspekt. Tilsatsen av stert hydrofile grupper til MS-301 eller MS310 forbedrer bindingen til en

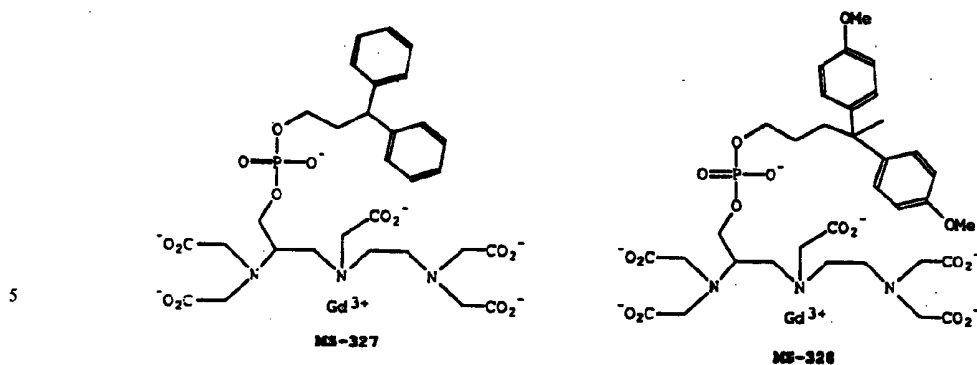
viss grad. Anordningen av fosfatgruppen i MS-315 og MS-321 mellom IEM og PPBM kan tillates den fullt hydrofobe overflate av PPBM og virke med det indre av HSA-setene og samtidig skape nye fordelaktige interaksjoner (for eksempel elektrostatisk eller hydrogenbinding) mellom forbindelsen og "ankel"-regionen i HSA-setene. Spesielt er det mulig at de negativt ladde fosfatgruppene er anbrakt slik at de virker bra med de positivt ladde residuer som står oppstilt langs "ankel"-regionen.

Som indikert over, kan prosentøkningen i AUC-konsentrasjonen avhenge av tiden da målingene ble utført. For eksempel økte tilsatsen av fosfat BHEM til MS-310 for å gi MS-321 AUC-konsentrasjon for 0 - 10 minutter fra 1,8 til 3,2 nM min., en 78 % økning. Imidlertid økte AUC-konsentrasjonen for 0 - 30 minutter fra 2,46 til 5,57 nM min., en 126 % økning.

De foretrukne kontrastmidler er:







De mest foretrukne kontrastmidler inneholdende chelateringsligander ifølge oppfinnelsen er MS-317, MS-322, MS-325 og MS-328. Den mest foretrukne er MS-325.

10 Ytterligere egenskaper for kontrastmidlene

Siden ulike chirale former av medikamenter eller biomolekyler kan påvirke deres ytelse *in vivo*, vil det sammen sannsynligvis være sant for de aktuelle kontrastmidlene. For hvert gitte chirale senter kan hver form ha høyere relaksivitet, blodhalveringstid, lavere toksisitet, færre metabolitter eller noen annen fordel eller kombinasjon av disse fordeler.

15 Disse chirale former vil være foretrukket.

For å lette administrasjonen av opptak, bør kontrastmidlene ha god vannløselighet. Fortrinnsvis er kontrastmidlene løselige i en konsentrasjon på minst 1,0 mM, mer foretrukket 10mM og mest foretrukket 100mM i vann ved romtemperatur.

20 For injisering bør de formulerte midler har kun moderat viskositet for å gi raske, hensiktsmessige injeksjoner. Viskositeten bør være mindre enn  $10, 20 \times 10^{-4} \text{ kg-s/m}^2$  (10 centipoise), eller foretrukket mindre enn  $5, 10 \times 10^{-4} \text{ kg-s/m}^2$  (5 centipoise), eller mest foretrukket mindre enn  $2,04 \times 10^{-4} \text{ kg-s/m}^2$  (2 centipoise).

25 For injisering bør de formulerte midler heller ikke har overdreven osmolalitet, da dette kan øke toksisitet. Osmolaliteten bør være mindre enn 3000 milliosmoles/kg, mer foretrukket mindre enn 2500 milliosmoles/kg eller mest foretrukket mindre enn 900 milliosmoles/kg.

### Anvendelse av kontrastmidlene

Det er også tilrettelagt for at IEM kan omfatte et farmasøytisk akseptabelt salt. Farmasøytisk akseptable salter ifølge oppfinnelsen innbefatter de avledet fra uorganiske eller organiske syrer eller baser. Innbefattet blant slike syresalter er de følgende: acetat, adipat, alginat, aspartat, benzoat, benzensulfonat, bisulfat, butyrat, citrat, kamforat, kamforsulfonat, syklopentranpropionat, diglukonat, didecylsulfat, etansulfonat, fumarat, glukohexanoat, glycerofosfat, hemisulfat, heptanoat, heksanoat, hydroklorid, hydrobromid, hydroiodid, 2-hydroksyetan-sulfonat, laktat, maleat, metansulfonat, 2-naftalensulfonat, nikotinat, oksalat, pamoat, pektinat, persulfat, 3-fenyl-propionat, pikrat, pivallat, propionat, succinat, tartrat, tiocyanat, tosylat og undecanoat. Basesalter innbefatter ammoniumsalter, alkalimetallsalter så som natrium- og kaliumsalter, jordalkalimetallsalter så som kalsium-, og magnesium- og sinksalter, salter med organiske baser så som disykloheksylaminsalter, N-metyl-D-glukamin, og salter med aminosyrer så som argining, lysin og så videre. Ytterligere kan de basiske nitrogenholdende grupper kvaterniseres med sådanne midler som lager alkylhalider, såsom metyl, etyl, propyl og butylklorid, bromider og iodider; dialkylsulfater så som dimetyl, dietyl, dibutyl og diamylsulfater, langkjedene halider så som decyl, lauryl, myristyl og stearylklorider, bromider og iodider, aralkylhalider så som benzyl og fenetylbromider og andre. Vann eller oljeløselige eller dispersible produkter erholdes derved. De foretrukne salter ifølge oppfinnelsen er N-metyl-D-glukamin, kalsium og natriumsalter.

De farmasøytiske sammensetninger ifølge oppfinnelsen omfatter enhver av kompleksene som er farmasøytisk akseptable salter derav sammen med enhver farmasøytisk akseptabel bærer, adjuvant eller vehikkel. Farmasøytisk akseptable bærere, adjuvanter og vehikler som kan anvendes i de farmasøytiske sammensetninger ifølge oppfinnelsen, innbefatter, men er ikke begrenset til, ionebyttere, aluminiumoksid, aluminiumstearat, lecitin, serumproteiner, så som humant serumalbumin, buffersubstanser så som fosfater, glycin, sorbinsyre, kaliumsorbat, TRIS (tris(hydroksymetyl)aminometan), partielle glyceridblandinger av mettede vegetabiliske fettsyrer, vann, salter eller elektrolytter så som proteinsulfat, dinatriumhydrogenfosfat, kaliumhydrogenfosfat, natriumklorid, sinksalter, kolloidalt silisiumoksid, magnesiumtrisilikat, polyvinylpyrrolidon, cellulosebaserte substanser, polyetylen glykol, natriumkarboksymetylcellulose, polyakrylater, vokser, polyetylen-polyoksypropylen, blokkpolymerer, polyetylen glykol og ullfett.

Ifølge den foreliggende oppfinnelse kan de farmasøytiske sammensetninger være i form av et sterilt injiserbart preparat, for eksempel en steril injiserbar vandig eller oleaginøs suspensjon. Denne suspensjonen kan formuleres ifølge kjente teknikker ved anven-

delse av egnede dispersjons- eller våtgivende midler og suspensjonsmidler. Det sterilt injiserbare preparatet kan også være en steril injiserbar løsning eller suspensjon i et ikke-toksisk parenteral-akseptabel diluent eller løsningsmiddel, for eksempel som en oppløsning i 1,3-butandiol. Blant de akseptable vehikle løsningsmidler som kan anvendes, er vann, Ringers løsning og isotonisk natriumkloridløsning. Ytterligere er sterile, fikserte oljer konvensjonelt anvendt som et løsningsmiddel eller suspensjonsmedium. For dette formål kan enhver ren fiksert olje anvendes innbefattende syntetiske mono- eller diglycerider. Fettsyrer så som oleinsyre og dens glyceridderivater, er anvendelige ved fremstilling av injiserbare preparater, slik også naturlig farmasøytisk akseptable oljer så som olivenolje eller lakserolje, spesielt i deres polyoksyetylerter versjoner. Disse oljeløsninger eller suspensjoner kan også inneholde en langkjedet alkoholdiluent eller dispersant så som Ph. Helv. eller lignende alkohol.

Da de aktuelle kontrastmidlene binder til plasmaproteiner, i noen tilfeller avhengig av dose og injiseringshastighet, kan bindingssetene på plasmaproteiner bli mettet. Dette vil føre til en redusert binding av midlet og kan kompromittere halveringstid eller tolerabilitet. Følgelig kan det være ønskelig å injisere midlet forhåndsbundet til et sterilt albumin eller astma-erstatningsløsning. Alternativt kan et apparat/sprøyte anvendes som inneholder kontrastmidlet og blander det med blod trukket opp i sprøyten, og dette reinjiseres i pasienten.

Chelateringsligandene og de diagnostiske sammensetninger ifølge oppfinnelsen kan administreres oralt, parenteralt, ved inhalasjonsspray, topikalt, rektalt, nasalt, bukalt, vaginalt eller via et implantert reservoar i doseringsformuleringer inneholdende konvensjonelle ikke-toksiske farmasøytisk akseptable bærere, adjuvanter og vehikler. Benevnelsen "parenteral" som anvendt heri, innebefatter subkutan, intravenøst, intramuskulært, intra-artikulært, intrasynovialt, intrasternalt, intratekalt, intrahepatisk, intralesjonalt og intrakraniell injeksjon eller infusjonsteknikker.

Når de administreres oralt kan de diagnostiske sammensetninger ifølge oppfinnelsen administreres i enhver oral akseptabel doseringsform innbefattende, men er ikke begrenset til, kapsler, tabletter, vannløselige suspensjoner eller løsninger. I det tilfellet av tabletter for oral anvendelse hyppig bærere som innbefatter laktose og maisstivelse. Smøremidler, så som magnesiumstearat, settes også til. For oral administrasjon i en kapselform, innbefatter anvendelige diluenter laktose og tørket maisstivelse. Når vanlige suspensjoner kreves for oral anvendelse, kombineres den aktive ingrediens med emulsjons- og suspensjonsmidler. Dersom ønskelig kan også visse søtningsstoffer, smakstilsetninger eller fargestoffer settes til.

Alternativt, når det administreres i form av suppositorier for rektal administrasjon, kan diagnostiske sammensetninger ifølge oppfinnelsen fremstilles ved å blande midlet med en passende ikke-irriterende eksipient som er fast ved romtemperatur, men flytende ved rektal temperatur og derfor vil smelte i rektum for å friggi medikamentet. Slike materialer innbefatter kakaosmør, bivoks og polyetylenglykoler.

Som vist tidligere, kan de diagnostiske sammensetninger ifølge oppfinnelsen også administreres topikalt, spesielt når mål for behandlingen innbefatter områder eller organer som er lett tilgjengelig ved topikal applikasjon, innbefattende nye, hud eller den nedre intestinale trakt. Passende topikale formuleringer fremstilles lett for hver av disse områder eller organer.

Topikal applikasjon for den nedre intestinale trakt kan utføres i en rektal suppositorieformulering (se over) eller i en passende klysterformulering. Topikal-transdermale lap- per kan også anvendes.

For topikal applikasjon kan de diagnostiske sammensetninger formuleres i en passende salve inneholdende den aktive komponent suspendert eller oppløst i en eller flere bæ- rere. Bærere for topikal administrasjon av ligandene ifølge oppfinnelsen innbefatter, men er ikke begrenset til mineralolje, flytende petrolatum, hvit petrolatum, propylen- glykol, polyoksyetylen, polyoksypropylenforbindelse, emulgerende voks og vann. Al- ternativt kan de diagnostiske sammensetninger formuleres i en passende losjon eller krem inneholdende de aktive forbindelser suspendert eller oppløst i en eller flere farma- søytiske akseptable bærere. Passende bærere innbefatter, men er ikke begrenset til, mi- neralolje, sorbitanmonostearat, polysorbat 60, cetylestervoks, cetearylalkohol, 2-oktyl- dodekanol, benzylalkohol og vann.

For oftal anvendelse kan de diagnostiske sammensetninger formuleres som mikroniserte suspensjoner i isoton, pH-justert sterilt salin, eller fortrinnsvis i form av løsninger i iso- ton, pH-justert sterilt saling, enten med eller uten et konserveringsstoff så som benzy- lalkoniumklorid. Alternativt kan de diagnostiske sammensetninger ved oftal anvendelse formuleres i en salve så som petrolatum.

For administrasjon ved nasal aerosol eller inhalasjon fremstilles de diagnostiske sam- mensetninger ifølge oppfinnelsen i henhold til teknikker som er kjent innen faget for farmasøytisk formulering, de kan fremstilles som løsninger i saline, ved anvendelse av benzylalkohol eller andre passende konserveringsmidler, absorpsjonspromotere for å

fremme biotilgjengelighet, fluorkarboner og/eller andre konvensjonelle oppløsnings- eller dispersjonsmidler.

Dosering avhenger av følsomhet ovenfor den diagnostiske avbildningsinstrumentering, samt sammensetning av kontrastmidler. For eksempel fordrer et kontrastmiddel inneholdende en svært paramagnetisk substans, for eksempel gadolinium (III), ved MRI-avbildning generelt en lavere dosering enn et kontrastmiddel inneholdende en paramagnetisk substans med et lavere magnetisk moment, for eksempel jern (III). Fortrinnsvis vil dosene være i området 0,001-1 mol/kg kroppsvekt pr. dag av den aktive metall-ligandkompleks. Mer foretrukket vil doseringene være i området 0,005-0,05 mmol/kg kroppsvekt pr. dag.

Det skal imidlertid forstås at en spesifikk doseringskur for enhver spesiell pasient også vil avhenge av en rekke faktorer innbefattende alder, kroppsvekt, generell helsetilstand, kjønn, diet, administrasjonstidspunkt, ekskresjonshastighet, medikamentkombinasjon og den behandelende lages evaluering.

Dersom applikasjonen er MRI-avbildning, utføres MRI-avbildning etter administrasjon av den passende dose av kontrastmidlet.

Valg av pulssekvens (inversjonsgjenerhvervelse), IR; spinn ekko, SE, ekkoplanar, EPI; tid for flying, TOF; turbo-flash; gradientekko, GE) og verdiene av avbildningsparameteret (ekkotid, TE; inversjonstid, TI; repetisjonstid, TR: flippvinkel etc.) fikk styres av den diagnostiske informasjonssøker. Generelt gjelder at dersom en ønsker å erholde T<sub>1</sub>-veid avbildning, bør TE være mindre enn 30 millisekunder (eller minimumsverdien) for å maksimere T<sub>1</sub>-veing. Motsatt dersom man ønsker å måle T<sub>1</sub>, bør TE være større enn 30 millisekunder for å minimere konkurrerende T<sub>1</sub>. TI og TR vil forbli om lag det samme for både T<sub>1</sub>- og T<sub>2</sub>-veid avbildninger; TI og TR er henholdsvis generelt i området 5-1000 og 2-1000 millisekunder.

De aktuelle MRI-kontrastmidlene er anvendelige ved generell avbildning av tumorer, blod-hjerne-barriere nedbrytelse og andre lesjoner. Dessuten er de svært anvendelige ved eksaminering av perfusjon, dvs. blodstrøm inn og ut av vev (hjertet, hjerne, ben, lunger, tumorer etc.) og blodkar (MR-angiografi). Ytterligere kan midlene anvendes til å fremme signalendringer i hjernen under kognitive hendelser (funksjonell MRI).

Det er lagt til rette for at kontrastmidlene også kan anvendes for å fremme en diagnostisk røntgenavbildning samt ultralyd og lysavbildning. I disse tilfeller

vil doseringene av midlet være om lag lik det i MRI-verdi (0,001-10 mmol/kg). For nukleær avbildning vil imidlertid doseringene være ved spornivåer. For alle disse teknikker er anvendelsen og administrasjon av kontrastmidlene og innstillingene på avbildningsmaskinene kjent innen faget eller anvender alminnelig aksepterte prinsipper.

- 5 For at oppfinnelsen skal forstås mer fullstendig, er de følgende eksempler gitt.

## EKSEMPLER

### Ekperimentelt

Dersom intet annet er indikert, erholdes alle materialer fra kommersielle leverandører og anvendes uten ytterligere rensing. THF ble destillert fra kaliumbenzofenonketyl  
10 umiddelbart før anvendelse. Metylenklorid ble destillert over kalsiumhydrid. Alle kolonnekromatografi ble utført under nitrogen ved flash-metode beskrevet av Still med kiselgel (230-400 mesh, EM-separasjon). Alle reaksjoner ble overvåket ved tynnsjikt-kromatografi (TCL) utført på aluminiumsstøttet kiselgel 60 F<sub>254</sub>, 0,2-mm plater (EM-separasjon), og forbindelsene ble visualisert under UV-lys (254 nm), Ninhydrin-Pluss  
15 reagent eller Dragendorffs reagens (begge Alltech) påfølgende oppvarming. Rutineproton NMR-spektra ble registrert ved 300 MHz i CDCl<sub>3</sub> med TMS som intern standard, unntak for spektrum registrert i D<sub>2</sub>O. Koblingskonstanter (J) er gitt i Hertz (Hz). <sup>31</sup>P NMR-spektra ble erholdt ved 121,4 MHz.

### Fremstilling av fosforamiditt-intermediat

#### 20 A. Serinylendiaminamid

Serin metylester hydroklorid (36,03 g, 232 mmol) ble oppløst i 400 ml etylendiamin og rørt ved romtemperatur ved 16 t. Etylendiaminet ble fjernet ved fordampning ved redusert trykk. Resten ble oppløst i 80 ml 4 N NaOH og ble konsentrert under redusert trykk. Dette material ble oppløst i metanol (150 ml), filtrert og konsentrert to ganger.  
25 Denne resten ble suspendert i metylenklorid (150 ml), og metanol (5-10 ml) ble satt til ved oppvarming inntil den oljede rest ble løst opp. Løsningen ble tørket over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrert gjennom celitt og konsentrert. Det viskøse oljeprodukt ble båret videre uten ytterligere rensing.

#### B. 2-Hydroksymetyldietylentriamin Trihydroklorid

Det ubehandlede amid (<230 mmol) ble oppløst i 100 ml THF. Boran/THF (1150 ml, 1,0 M) ble langsomt satt til under den omrørte løsning. Reaksjonen ble deretter tilbake-  
 løpt under argon i 16 t. Det overflødig boran ble brått avkjølt ved forsiktig tilsats av  
 250 ml etanol ved 0°C. Reaksjonsblandingen ble konsentrert under redusert trykk. Kon-  
 5 sentrert HCl (100 ml) ble langsomt satt til under avkjøling, og løsningen ble deretter  
 tilbakeløpt i 24 t. Produktblandingen ble konsentrert under redusert trykk og ble krys-  
 tallisert fra MeOH/EtOH. Dette kan gi 39,92 g hvitt faststoff (71% fra metylester).

#### C. 1-Hydroksymetyl-DTPA-penta-t-butylester (I)

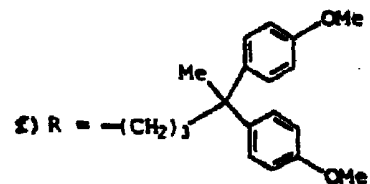
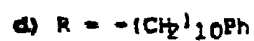
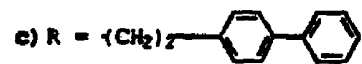
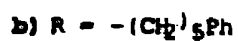
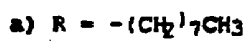
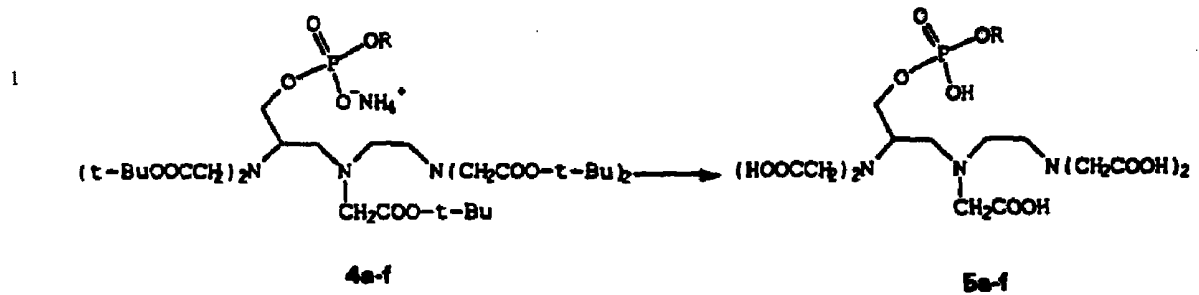
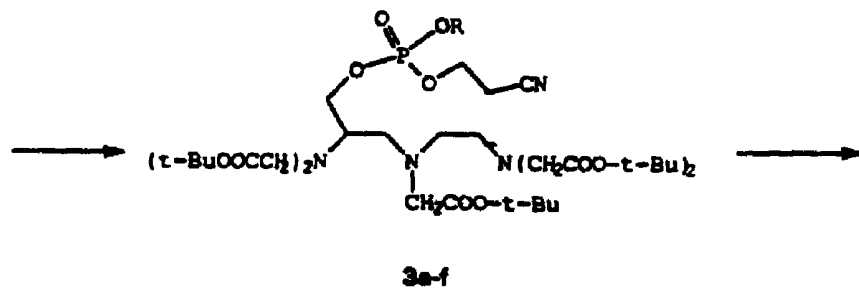
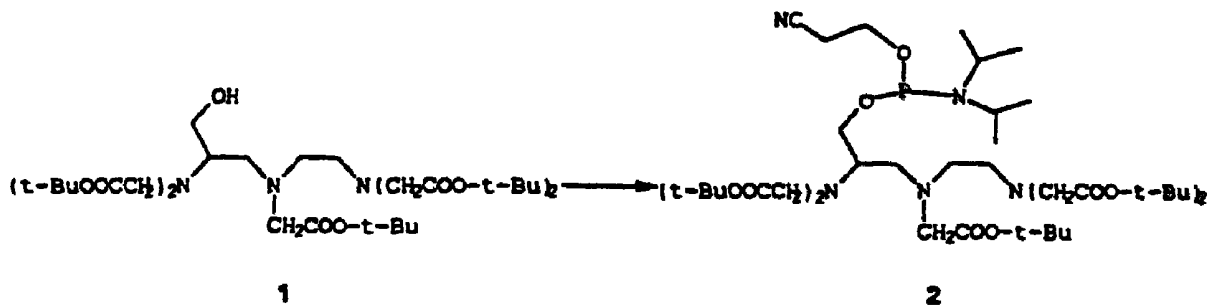
En løsning av hydroksymetyl dietylentriamin trihydrokloridet (30,25 g, 124,70 mmol)  
 10 og diisopropyletylamin (218 ml, 1,25 mol) i 300 ml tørr DMF ved romtemperatur under  
 N<sub>2</sub> ble tilsatt t-Butyl bromacetat (126 ml, 0,78 mol) og rørt i 24 t ved romtemperatur.  
 Løsningsmidlet ble deretter dampet av *in vacuo*, resten ble oppløst i EtOAc og ekstra-  
 hert med H<sub>2</sub>O, NaHCO<sub>3</sub> (mettet), H<sub>2</sub>O og NaCl (mettet). Resten ble rensed ved kisel-  
 gelkromatografi (kun CHCl<sub>3</sub>-CHCl<sub>3</sub> : MeOH = 100:1) for å gi det rene produkt (olje,  
 15 70,12 g, 81,7%):Rf (CHCl<sub>3</sub>:MeOH = 10:1) 0,54, (eter: heksaner = 2:1) 0,23; <sup>1</sup>H-NMR  
 (CDCl<sub>3</sub>) d 1,44 (brs, 45H), 2.44-3.06 (m, 6H), 3.24 og 3.29 (hver d, hver 1H, J = 16,8),  
 3.34-3.58 (m, 10H), 3.66 (dd, 1H, J = 11.2, 5.3), 4.20-4.70 (br, 1H).

#### D. Fosforamiditt-intermediat (2)

En rørt løsning av penta-t-butylester (1) (12,88 g, 18,71 mmol) og diisopropyletylamin  
 20 (4,55 g, 36 mmol) i destillert CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100 ml) ble tilsatt 2-cyanoetyl N,N-diisopropyl-  
 klorofosforamidit (5,92 g, 25 mmol) ved romtemperatur. Blandingen ble rørt ved rom-  
 temperatur i 2 t, og løsningen ble fortynnet med 100 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> og vasket med iskald  
 10% NaHCO<sub>3</sub>-løsning (100 ml), H<sub>2</sub>O (100 ml) og saltvann (100 ml) og tørket over  
 MgSO<sub>4</sub>. Det organiske sjikt ble dampet inn for å gi råproduktet i form av en blekgul olje  
 25 (2). Denne råolje kan anvendes for den neste koblingsreaksjon uten ytterligere rensing.

Eksempelene 1-6 under viser at syntesen av noen av de foretrukne kontrastmidler ifølge  
 oppfinnelsen i henhold til det følgende generaliserte skjema:

#### Syntese av fosfodiesterligander





Eksempel 1Fremstilling av MS-315 – (2)-(3a)-(4a)-(5a)A. n-Oktyloksyfosfat (3a)

Fremstilt fra et ubehandlet fosforamiditintermediat (2) (fremstilt fra 4,40 g, 6,40 mmol  
 5 1-hydroksymetyl-DTPA-penta-t-butylester (1) den samme fremgangsmåte beskrevet for  
 (3d) og rensset ved kiselgel kolonnekromatografi (CHCl<sub>3</sub>/MeOH) [2,71 g, 44,7% totalt  
 utbytte fra (2)]. Rf (CHCl<sub>3</sub> : MeOH = 10 : 1) 0,33.

B. n-Oktyl fosfodiester (4a)

Fremstilt fra fosfatet (3) (2,70 g, 2,84 mmol) ved den samme fremgangsmåte som  
 10 beskrevet for (4e) (2,17 g, 85,1%).

C. MS-315 (5a)

En løsning av (4a) (2,16 g, 2,41 mmol) i trifluoreddiksyre (20 ml) stående ved  
 romtemperatur i 1 t. Løsningsmidlet ble dampet inn, og resten ble oppløst i 5 ml H<sub>2</sub>O.  
 Løsningen ble rensset med C<sub>18</sub> revers fase kiselgelkolonne (Sep-Pak forpakket patron,  
 15 Waters) (bare H<sub>2</sub>O – CH<sub>3</sub>CN : H<sub>2</sub>O = 1 : 4) for å gi det rene produkt (5a) (1,13 g,  
 76,2%). <sup>31</sup>P-NMR (D<sub>2</sub>O) D2.3.

Eksempel 2Fremstilling av MS-317 – (2)-(3b)-(4b)-(5b)A. 5-fenyl-1-pentyl oksyfosfat (3b)

Fremstilt fra et ubehandlet fosforamidit intermediat (2) (fremstilt fra 2,72 g, 3,96 mmol  
 20 1-hydroksy-DTPA-penta-t-butylester (1)) ved samme fremgangsmåte beskrevet for (3d)  
 med unntak av at råproduktet (3b) ble anvendt for den neste reaksjon uten kiselgel  
 kolonnekromatografi (4,28 g råprodukt). Rf (CHCl<sub>3</sub> : MeOH = 10 : 1) 0,26.

B- 5-fenyl-1-pentyl fosfodiester (4b)

Fremstilt fra fosfatet (3b) ved den samme fremgangsmåte som beskrevet for (4e) med  
 25 unntak av råproduktet ble rensset med Sephadex LH 20 kromatografi (2,72 g rå). Rf  
 (CHCl<sub>3</sub> : MeOH = 10 : 1) 0,11.

C. MS-317 (5b)

Fremstilt fra råproduktet (4b) (2,72 g) ved den samme fremgangsmåte som beskrevet  
 30 for (5a) [1,12 g, 43,5% totalt utbytte fra fosforamidit intermediat (2)]. <sup>31</sup>P-NMR (D<sub>2</sub>O)  
 d0,1.

Eksempel 3

Fremstilling av MS-322 – (2)-(3c)-(4c)-(5c)A. 2-(4-Bifenylyl)-1-etoksyfosfat (3c)

Fremstilt fra et rensset fosforamidat intermediat (2) (3,50 g, 3,87 mmol) ved den samme fremgangsmåte som beskrevet for (3d) med unntak av råproduktet av (3c) (4,13 g råprodukt) ble anvendt for den neste reaksjon uten kiselgel kolonnekromatografi.

B. 2-(4-Bifenylyl)-1-etyl fosfodiester (4c)

Fremstilt fra fosfatet (3c) (4,13 g råprodukt) ved den samme fremgangsmåte som beskrevet for (4e) med unntak av råproduktet ble rensset med Sephadex LH 20 kromatografi (2,34 g råprodukt).

10 C. MS-322 (5c)

Fremstilt fra råproduktet (4c) (2,34 g) ved den samme fremgangsmåte som beskrevet for (5a) [1,15 g, 43,5% totalt utbytte fra fosforamidit intermediat (2).  $^{31}\text{P-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ) d3.7.

Eksempel 4Fremstilling av MS-323 – (2)-(3d)-(4d)-(5)15 A. 10-Fenyl-1-dekanoksy fosfat (3d)

Et rensset fosforamidat (2) (15,20 g, 16,81 mmol) i dest.  $\text{H}_3\text{CN}$  (50 ml) ble tilsatt 10-fenyl-1-dekanol (9,00 g, 38,39 mmol) og 1H-tetrazol (2,36 g 33,70 mmol) i dest.  $\text{CH}_3\text{CN}$  (50 ml). T-butylhydroperoksid (90%, 2733 ml, 21,00 mmol) ble tilsatt og reagert og fikk stå i 1 t ved romtemperatur. Løsningsmidlet ble konsentrert *in vacuo* (ca. 10 ml), og resten ble delt mellom AcOEt og  $\text{H}_2\text{O}$ . Det organiske sjikt ble vasket med  $\text{H}_2\text{O}$  og NaCl (mettet), tørket over  $\text{MgSO}_4$  og inndampet. Resten ble rensset med kiselgel kolonnekromatografi (kun heksaner – heksaner : eter = 1 : 1 og deretter  $\text{CHCl}_3$  : MeOH = 100 : 1 – 50 : 1) for å gi produktet (3d) (14,12 g, 79,7%).

Rf ( $\text{CHCl}_3$  : MeOH = 10 : 1) 0,35.

25 B. 10-Fenyl-1-dekanyl fosfodiester (4d)

Fremstilt fra fosfat (3d) (12,27 g, 11,65 mmol) ved den samme fremgangsmåte for (4e) (10,52 g, 90,3%).

Tf ( $\text{CHCl}_3$  : MeOH = 10 : 1) 0,15.

C. MS-323 (5d)

30 Blandingen av (4d) (10,50 g, 10,50 mmol) i  $\text{CHCl}_3$  (spormetallkvalitet, 15 ml) og eter (15 ml) ble rørt ved romtemperatur over natten, og eter ble dampet av *in vacuo*. Det

resulterende vandige sjikt, ( $\text{pH} < 0$ ) ble tilsatt cNaOH for å justere pH til 1,5. Det precipiterte hvite faststoff ble oppsamlet ved filtrasjon og vasket med fortynnet HCl-løsning ( $\text{pH} 1,5$ , 3 ganger, 100 ml hver) og eter (3 ganger, 200 ml hver). Det viste hvite faststoff ble tørket under pumpe i 24 t ved romtemperatur for det rene produkt (5d) (6,80 g, 90,0%).  $^{31}\text{P}$ -NMR ( $\text{D}_2\text{O} + \text{NaOD}$ ,  $\text{pH} = 13,5$ ) d4,9.

### Eksempel 5

#### Fremstilling av MS-325 – (2)–(3e)–(4e)–(5e)

##### A. 4,4-Difenylsykloheksyloksy fosfat (3e)

Fremstilt fra et rensset fosforamidit intermediat (2) (4,52 g, 5,00 mmol) ved den samme fremgangsmåte som beskrevet for (3d) med unntak av kiselgel kolonnekromatografi oppløsninger (bare  $\text{CH}_2\text{Cl}_2 - \text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{MeOH} = 100 : 1$ ) (2,97 g, 55,4%).  $R_f$  ( $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} = 10 : 1$ ) 0,47.

##### B. 4,4-difenylsykloheksyl fosfodiester (4e)

En oppløsning av (3e) (2,14 g, 2,00 mmol) i 2 M  $\text{NH}_3$ -MeOH (30 ml) ble rørt ved romtemperatur i 5 t. Oppløsningen ble dampet av og resten (4e) (2,00 g, 98,3%) ble anvendt for den neste reaksjon uten videre rensing.

$R_f$  ( $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} = 10 : 1$ ) 0,12.

##### C. MS-325 (5e)

Blandingen (4b) (2,00 g, 1,96 mmol) i  $\text{CHCl}_3$  (spormetallkvalitet, 5 ml) og eter (5 ml) ble rørt ved romtemperatur over natten. Løsningsmidlene ble dampet av, resten ble tritureret med  $\text{H}_2\text{O}$  (100 ml). Det resulterende bunnfall ble filtrert og vasket med  $\text{H}_2\text{O}$  (5 ganger, 10 ml hver) og eter (5 ganger, 50 ml hver). Det faste produkt ble tørket under pumpe ved romtemperatur i 24 t for å gi det ene produkt (5b) (1,18 g, 81,5%).  $^{31}\text{P}$ -NMR ( $\text{D}_2\text{O} + \text{NaOD}$ ,  $\text{pH} = 13,5$ ) d -0,3.

### Eksempel 6

#### Fremstilling av MS-328 – (2)–(3f)–(4f)–(5f)

##### A. 4,4-bis(4-Metoksyfenyl) pentyl fosfat (3f)

Fremstilt fra 32,5 g (36 mmol) av råproduktet fosforamidit (2) og 4,4-bis(4-Metoksyfenyl) pentanol (21,06 g 70 mmol) ved fremgangsmåte beskrevet for (3d). Kromatografi ble utført i 50% EtOAc/heksan for å gi 18,27 g av en gul olje som var svært forurenset med utgangsalcoholen.  $R_f$  (50% EtOAc/Heksan) 0,4.

B. 4,4-bis (4-Metoksyfenyl)pentyl fosfodiester (4f)

En oppløsning av (3f) (18,27 g) ble fremstilt ved den samme fremgangsmåte beskrevet for (4e) (17,26 g).

C. MS-328 (5f)

- 5 Fremstilt fra (4f) (17,26 g) ved fremgangsmåten for (5a) med et utbytte på 4,88 g av hvitt faststoff (4,87 mmol, 13% utbytte fra fosforamidit).  $^{31}\text{P-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ) d2.3.

Eksempel 7

*In situ* formulering av N-metyl-glukaminsaltet av gadoliniumkomplekset av 5a (MS-315) (200 mM, 5 ml)

- 10 Gadoliniumoksid ( $\text{Gd}_2\text{O}_3$ ) (0,181 g, 0,5 mmol), forbindelse (5a) (92 vekt%, 0,703 g, 1,05 mmol) og N-metyl-glukamin (NMG) (4,1 g, 3,6 mmol) ble veid i et reagensrør. De-ionisert vann (3,5 ml) ble satt til, og blandingen ble rørt ved  $95^\circ\text{C}$  i 7 t, hvorefter løsningen ble avkjølt i romtemperatur, og volumet ble justert til 5,0 ml med de-ionisert vann. Løsningen ble filtrert gjennom et  $2 \times 10^{-6}$  m (2 mikron) filter for å gi en vandig  
15 løsning av tittelforbindelsen.

Eksempel 8

*In situ* formulering av N-metyl-glukaminsaltet av gadoliniumkomplekset av 5b (MS-317) (200 mM, 4 ml).

- 20 Gadoliniumoksid ( $\text{Gd}_2\text{O}_3$ ) (0,145 mmol), forbindelse (5b) (81 vekt%, 0,706 g, 0,84 mmol) og N-metyl-glukamin (NMG) (0,60 g, 8,1 mmol) ble veid i et reagensrør. De-ionisert vann (3 ml) ble satt til, og blandingen ble rørt ved  $95^\circ\text{C}$  i 6 t, hvorefter løsningen ble avkjølt til romtemperatur, og volumet ble justert til 4,0 ml med de-ionisert vann. Løsningen ble filtrert gjennom et  $2 \times 10^{-6}$  m (2 mikron) filter for å gi en vandig løsning av tittelforbindelsen.

25 Eksempel 9

*In situ* formulering av N-metyl-glukaminsaltet av gadoliniumkomplekset av 5c (MS-322) (200 mM, 4 ml)

- Gadoliniumoksid ( $\text{Gd}_2\text{O}_3$ ) (0,145 g, 0,4 mmol), forbindelse (5c) (79 vekt%, 0,729 g, 0,84 mmol) og N-metyl-glukamin (MNG) (0,61 g, 3,1 mmol) ble veid i et reagensrør.  
30 De-ionisert vann (3 ml) ble satt til, og blandingen ble rørt ved  $95^\circ\text{C}$  i 6 t, hvorefter løsningen ble avkjølt i romtemperatur, og volumet ble justert til 4,0 ml med de-ionisert vann. Løsningen ble filtrert gjennom et  $2 \times 10^{-6}$  m (2 mikron) filter for å gi en vandig løsning av tittelforbindelsen.

Eksempel 10

In situ av N-metyl-glukaminsaltet av gadoliniumkomplekset av 5e (MS-325) (200 mM, 5 ml)

Gadoliniumoksid ( $Gd_2O_3$ ) (0,181 g, 0,5 mmol), forbindelse (5e) (95 vekt%, 0,820 g, 3,5 mmol) og N-metyl-glukamin (NMG) (0,68 g, 3,5 mmol) ble veid i et reagensrør. De-ionisert vann (3,5 ml) ble satt til, og blandingen ble rørt ved 95°C i 6 t, hvorefter løsningen ble avkjølt i romtemperatur, og volumet ble justert til 5,0 ml med de-ionisert vann. Løsningen ble filtrert gjennom et  $2 \times 10^{-6}$  m (2 mikron) filter for å gi en vandig løsning av tittelforbindelsen.

10 Eksempel 11

In situ formulering av N-metyl-glukaminsaltet av gadoliniumkomplekset av 5f (MS-328) (200 mM, 5 ml)

Gadoliniumoksid ( $Gd_2O_3$ ) (0,181 g, 0,5 mmol), forbindelse (5e) (97 vekt%, 0,850 g, 1,05 mmol) og N-metyl-glukamin (NMG) (0,62 g, 3,2 mmol) ble veid i et reagensrør. De-ionisert vann (3,5 ml) ble satt til, og blandingen ble rørt ved 95°C i 6 t, hvorefter løsningen ble avkjølt i romtemperatur, og volumet ble justert til 5,0 ml med de-ionisert vann. Løsningen ble filtrert gjennom et  $2 \times 10^{-6}$  m (2 mikron) filter for å gi en vandig løsning av tittelforbindelsen.

Eksempel 12

20 Fremstilling av N-metyl-glukaminsaltet av gadoliniumkomplekset av 5b (MS-317)

Gadoliniumoksid ( $Gd_2O_3$ ) (0,50 g, 1,38 mmol), forbindelse (5b) (87 vekt%, 1,87 g, 2,5 mmol) og N-metyl-glukamin (NMG) (1,53 g, 7,8 mmol) ble veid i et reagensrør. De-ionisert vann (8 ml) ble tilsatt og blandingen ble rørt ved 95°C i 6 t, deretter ble oppløsningen kjølt til romtemperatur og volumet justert til 9,0 ml med de-ionisert vann. Løsningen ble ladet på en 10-g Sep-Pak® kolonne og eluert med vann. Løsningen ble dampet inn under redusert trykk, og den faste, hvite glassaktige rest ble tørket ved høyvakuum i 48 t. Utbytte: 3.50 g (2.48 mmol, 99%). Anal. Calc. for  $(NMH^*)_3[Gd/5e^5]$  ( $H_2O$ ) ( $C_4H_9GdN_6O_{30}P$ ); C, 40.08; H, 6.51; N, 5.97; Gd, 11.16.

Funnet: C, 40.24; H, 6.69; N, 5.88; Gd, 10.11.

30 Eksempel 13

Fremstilling av N-metyl-glukaminsaltet av gadoliniumkomplekset av 5d (MS-323)

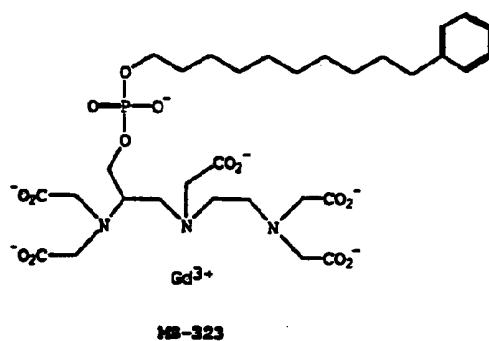
Gadolinium klorid heksahydrat ( $GdCl_3 \cdot 6H_2O$ ) (2,11 g, 5,68 mmol), forbindelse 5d (74 vekt%, 5,82 g, 5,98 mmol) og N-metyl-glukamin (NMG) (6,06 g, 31 mmol) ble veid i en 50 ml rundbunnet kolbe. De-ionisert vann (16 ml) ble satt til, og deretter ble blan-

dingen rørt ved 95°C i 4 t og avkjølt ved romtemperatur. Oppløsningen ble ladd på en C-18 kolonne (200 g) og eluert med vann-metanol 1:1 blanding. Løsningen ble dampet inn under redusert trykk for å gi et hvitt, glassaktig faststoff. Utbytte: 8,0 g (5,41 mmol, 95%). Anal. Calcd. for (NMGH\*)<sub>3</sub>[Gd(5d<sup>5</sup>)(H<sub>2</sub>O)] (C<sub>52</sub>H<sub>100</sub>GdN<sub>6</sub>O<sub>30</sub>P) : C, 42.27; H, 6.82; N, 5.69; Gd, 10.64. Funnet: C, 42.04; H, 7.03; N, 5.83; Gd, 9.55.

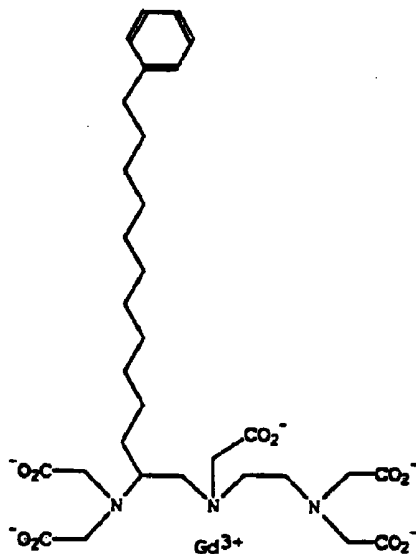
#### Eksempel 14

Det følgende kontrastmiddel har en binding til HSA på over 95%.

10

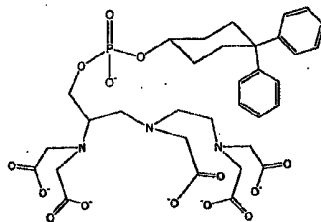
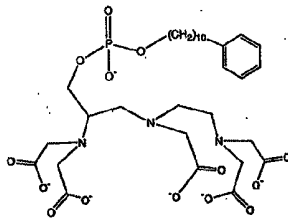
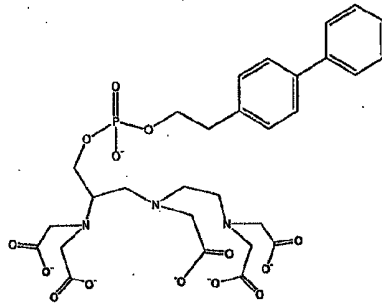
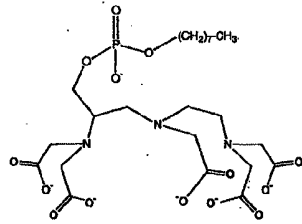


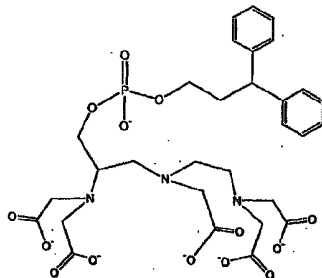
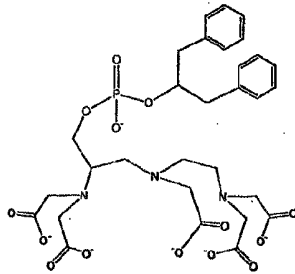
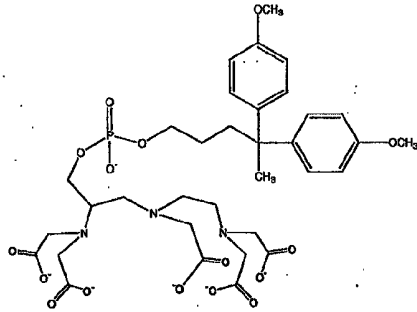
Det er vist å ha en AUC-kons. (i 0 til 10 minutter) 100% eller mye større enn den med følgende analog:



## Patentkrav

1. Chelateringsligand valgt fra de følgende strukturer:

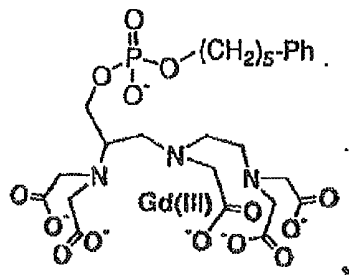




eller Gd(III)-komplekset derav eller deres farmasøytisk akseptable salter.

2. Farmasøytisk akseptabelt salt ifølge krav 1, hvor saltet er valgt fra gruppen bestående av kalsium, natrium, N-metyl-glukamin samt blandinger derav.

3. Diagnostisk avbildningskontrastmiddel som har den følgende struktur:





hvor Ph = fenyl

eller farmasøytisk akseptable salter derav.

4. Farmasøytisk akseptabelt salt ifølge krav 3, hvor saltet er N-metyl-glukamin.
5. Diagnostisk sammensetning av et Gd(III)-kompleks ifølge ethvert av kravene 1 – 4 eller farmasøytisk tilsvarende salt derav samt et bæremiddel, adjuvant eller vehikkel.
6. Diagnostisk sammensetning ifølge krav 5, ytterligere omfattende en fri organisk ligand eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav.
7. Anvendelse av et Gd(III)-kompleks ifølge ethvert av kravene 1 – 4 for fremstilling av en diagnostisk sammensetning for MR-avbildning for å undersøke vaskulaturen av et vev.
8. Anvendelse av et Gd(III)-kompleks ifølge ethvert av kravene 1 – 4 for fremstilling av en diagnostisk sammensetning for MR-avbildning for undersøkelse av perfusjonen i et vev.
9. Anvendelse ifølge krav 8, hvor nevnte vev er valgt fra gruppen bestående av en tumor, et hjerte, en hjerne, et ben, en lunge og en nyre.
10. Anvendelse av Gd(III)-komplekset ifølge ethvert av kravene 1 – 4 for fremstilling av en diagnostisk sammensetning for MR-avbildning for overvåkning av en menneskehjerne under kognitive hendelser.
11. Anvendelse av et Gd(III)-kompleks som definert i ethvert av kravene 1 – 4 for fremstilling av en diagnostisk sammensetning for MR-avbildning for bestemmelse av blodvolum i et vev.