(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 602 07 288 T2** 2006.05.18

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 438 318 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **602 07 288.3**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US02/34242**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **02 773 911.9**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 03/035655**
(86) PCT-Anmeldetag: **22.10.2002**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **01.05.2003**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **21.07.2004**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **09.11.2005**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **18.05.2006**

(51) Int Cl.[8]: ***C07F 9/6524*** (2006.01)
C07F 9/6558 (2006.01)
C07F 9/6561 (2006.01)
A61K 49/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
355684 P **22.10.2001** **US**

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

(73) Patentinhaber:
Dow Global Technologies, Inc., Midland, Mich., US; Texas Tech University, Lubbock, Tex., US

(72) Erfinder:
KIEFER, E., Garry, Lake Jackson, US; BORNHOP, J., Darryl, Lubbock, US

(74) Vertreter:
Weickmann & Weickmann, 81679 München

(54) Bezeichnung: **GEWEBESPEZIFISCHE FLUORESZIERENDE CHELATE**

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

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

Beschreibung

[0001] Diese Erfindung betrifft visuelle gewebespezifische Lanthanoid-, Terbium-, Europium- oder Dysprosiumchelate, die als visuelle kontrasterhöhende Mittel oder diagnostische Mittel verwendet werden können.

[0002] Abbilden durch Fluoreszenz wird im Zentrum zahlreicher chemischer und biomedizinischer Analysepläne gefunden. Viele dieser Pläne basieren auf der Einführung einer fluoreszierenden Spezies als Marker, Farbe, Farbstoff oder Indikator [J.-M. Devoisselle et al., Optical Engineering 32(2), 239 (1993), R. P. Haugland und A. Minta, "Design and Application of Indicator Dyes (Design und Anwendung von Indikatorfarbstoffen)", Noninvasive Techniques in Cell. Biol., Hrsg. B. H. Satir, Kap. 1, S. 1 (Wiley-Liss, New York, NY, 1990, D. J. Gross, "Quantitative Single Cell Fluorescence Imaging of Indicator Dyes (Quantitative Einzelzellfluoreszenzabbildung von Indikatorfarbstoffen)", Noninvasive Techniques in Cell. Biol., Hrsg. B. H. Satir, Kap. 2, S. 21 (Wiley-Liss, New York, NY, 1990)].

[0003] Von Lanthanoidionen abgeleitete organische Chelate werden als empfindliche Fluoreszenzmarker für zeitaufgelöste fluorometrische Tests [E. P. Diamandis, Clin. Biochem. 21, 139–150 (1988), Clin. Chim. Acta. 194, 19–50 (1990), Anal. Chem. 62, 11 49A–11 57A (1990), E. Soini und T. Lovgren, Crit. Rev. Anal. Chem. 18, 105–154 (1987)] immer wichtiger. Insbesondere sind Terbium- und Europiumkomplexe für diese Anwendungen aufgrund der effektiven Fluoreszenzemission im sichtbaren Bereich von signifikantem Wert (E. P. Diamandis, US-Patent 5,312,922). Beide Ionen zeigen eine schwache Fluoreszenzemission in ihrer nichtkomplexierten Form, aber wenn sie mit einem geeigneten organischen Liganden chelatisiert sind, ist diese sichtbare Emission dramatisch erhöht. Daher wirken die organischen Liganden als eine Antenne zum Absorbieren ultravioletter Strahlung und zur Übertragung dieser Energie auf das Metallion, das dann die absorbierte Energie in Form von sichtbarem Licht dissipiert. Die mechanistischen Details dieses Phänomens sind gut untersucht und wurden ausgiebig dokumentiert [A. P. B. Sinha, Fluorescence and Laser Action in Rare Earth Chelates/Spectroscopy in Inorganic Chemistry (Fluoreszenz und Laserwirkung in Seltenerdchelaten/Spektroskopie in der anorganischen Chemie), Band II, Academic Press, (1971)].

[0004] Es gibt zahlreiche Chelate, die zur langlebigen Fluoreszenz fähig sind, aber nicht alle dieser Komplexe sind für biologische Anwendungen geeignet, wobei ein Grund ihre Instabilität in wässrigen Medien ist [G. Kallistratos, Fluorescent Properties of Aromatic Complexes with Rare Earths and Other Elements of the IIIa-Group (Fluoreszenzeigenschaften aromatischer Komplexe mit Seltenen Erden und anderen Elementen der IIIa-Gruppe)/Chemika Chronika. Neue Serie, 11, 249–266 (1982)]. Tatsächlich ist eine große Mehrheit fluoreszierender Chelate nur unter nichtwässrigen Bedingungen wirksam. Dies beruht weitgehend auf der Instabilität des Komplexes in wässrigen Lösungen, was dazu führt, dass nichtkomplexiertes Metall vorhanden ist und den Fluoreszenzweg quencht, der für die sichtbare Lichtemission verantwortlich ist. Schließlich wären Komplexe dieses Typs bei niedrigen Konzentrationen keine empfindlichen Marker und würden daher Toxizitätsprobleme in vivo aufgrund von einer Metallablagerung in Weichteilen zeigen.

[0005] WO 94/26275 betrifft 2-Pyridylmethylenpolyazamacrocyclophosphonsäuren, Komplexe und Derivate davon, die als Kontrastmittel beim Magnetresonanzabbilden verwendet werden können. WO 94/26753 betrifft ein Verfahren zur Herstellung von azamakrozyklischen oder -azyklischen Aminophosphonatesterderivaten. Die hergestellten Verbindungen sind Liganden, die als diagnostische oder therapeutische Mittel verwendbar sind. WO 97/40055 betrifft visuelle gewebespezifische Terbium-, Europium-, Samarium- und Dysprosiumchelate, die als visuelle Kontrastverstärkungsmittel oder diagnostische Mittel verwendet werden können.

[0006] In den letzen Jahren wurde bewiesen, dass chelatbildende Mittel basiernd auf tetraazamakrozyklischen Gerüsten zur Erzeugung von wasserstabilen Lanthanoidchelaten extrem wertvoll sind. Insbesondere wurde gezeigt, dass chelatbildende Aminocarboxylat- und Aminophosphonatmittel, die aus 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan abgeleitet wurden, hochstabile Lanthanoidchelate bilden [W. P. Cacheris, A. D. Sherry, Inorg. Chem. 26, 958–960 (1987), J. Simón, J. R. Garlich, D. A. Wilson und K. McMillan, US-Patent 4,976,950]. Der überlegene Charakter dieser Chelatklasse machte sie für diagnostische und therapeutische medizinische Anwendungen verwendbar, wie zum Beispiel Abbildung durch magnetische Resonanz und Knochenmarkablation. Des Weiteren haben bestimmte Typen dieser makrozyklischen chelatbildenden Mittel, die eine aromatische Gruppe enthalten, wie zum Beispiel einen Pyridinkern, sehr effiziente Fluoreszenzeigenschaften mit Terbium und Europium gezeigt (J. Kankare, J. Takalo und P. Pasanen, US-Patent 4,920,195). In diesem Patent zeigen Kankare et al., dass ein 14-gliedriges makrozyklisches Europiumchelat, das einen Pyridinkern enthält, an menschliches IgG konjugiert werden kann. Das resultierende Konjugat enthält daher eine hochsensitive fluoreszierende Markierung (das Chelat), welche durch Fluoreszenz-Immunotestverfahren quantifiziert werden kann.

[0007] Die Verwendung von paramagnetischen makrozyklischen Chelaten basierend auf Gadolinium (Gd) als Kontrastmittel für magnetische Resonanzabbildungen hat beträchtliche Aufmerksamkeit auf sich gezogen. Die Anziehungskraft der Lanthanoidchelate ist direkt auf ihre kinetische und thermodynamische Stabilität in der schwierigen wässrigen Umgebung zurückzuführen, der man im menschlichen Körper begegnet. Geeignete Modifikationen, die eine deutliche Fluoreszenz verursachen, können bei diesem Ligandentyp gemacht werden, wenn Lanthanoide wie zum Beispiel Terbium (Tb) und Europium (Eu) im zentralen Kern sind. Kim et al., Inorg. Chem. 34, 2233–43 (1995) haben in einer kürzlichen Studie über einige mögliche MRI-Kontrastmittel basierend auf makrozyklischen Pyridin enthaltenden Liganden berichtet. In dieser Studie wurde die Wasserkoordination der inneren Sphäre bestimmt, indem die Fluoreszenzeigenschaften der Terbium- und Europiumchelate gemessen wurden.

[0008] Die Wichtigkeit makrozyklischer Lanthanoidchelate für medizinische Anwendungen wuchs kontinuierlich mit der Entwicklung gewebespezifischer Mittel. Bis jetzt haben sich die Anwendungen auf eine Chelatisierung radioaktiver und paramagnetischer Metallionen für die Therapie und Diagnose fokussiert (J. Simón, J. R. Garlich, D. A. Wilson, K. MacMillan, US-Patent 4,976,950, Beispiele von Gadoliniumchelaten für MRI sind Prohance™ von Squibb und Dotarem™ von Guerbet). Jedoch haben diese Chelate keinerlei Fluoreszenzeigenschaften.

[0009] Die Verwendung von fluoreszierenden Chelaten als visuelle gewebespezifische Mittel wurde im US-Patent 5,982,627 (G. E. Kiefer und D. J. Bornhop) diskutiert. Dieses sind makrozyklische Lanthanoidchelate, die fluoreszieren, wenn sie mit UV-Licht in dem relativ kurzen 260–280 nm-Wellenlängenbereich angeregt werden, die zur visuellen Detektion von Colonkrebs verwendet werden können, wenn sie mit UV-Licht beleuchtet werden.

[0010] Jedes Jahr entwickeln etwa 31.000 Amerikaner Mundkrebs (4 Prozent aller Krebse in Männern und 2 Prozent in Frauen). [E. Baden, CA Cancer J. Clin. 37(1), 49–62 (1987).] Etwa die Hälfte dieser Krebspersonen ist innerhalb von 5 Jahren nach der Diagnose tot, und von den Überlebenden haben viele Entstellungen und/oder machen ein funktionelles Zugeständnis. Daher ist die frühe Diagnose wichtig, da diese das Überleben von 50 Prozent auf 80 Prozent erhöhen könnte [S. Silverman Jr. und M. Gorsky, J. Am. Dent. Assoc. 120(5), 495–499 (1990).] Die Inzidenz von zweiten primären Carcinomen im Ösophagus und oberem aerodigestivem Trakt wurde auf zwischen 2–30 Prozent geschätzt [D. P. Varbec, Trans. Pa. Acad. Ophthalmol. Otolaryngol. 32(2), 177–191 (1979), P. H. Marks und F. G. Schechter, Ann Thorac. Surg. 33(4), 324–332 (1982), J. Gluckman, Laryngoscope 3, 90 (1983)]. Eine Detektion dieser zweiten primären Tumoren im frühen Stadium wäre vorteilhaft.

[0011] Das am meisten verwendete nichtinvasive Verfahren, welches im Moment für die frühe Detektion von Mundkrebs verwendet wird, ist das grobe Sichtbarmachen unter Weisslichtbeleuchtung. Aufgrund des niedrigen visuellen Kontrastes für abnormales Gewebe kann dieses Verfahren problematisch sein, insbesondere für die frühe Detektion von dysplastischen und prämalignen Läsionen, wenn die Unterscheidung derartiger Läsionen von nichtmalignen Läsionen sehr schwer ist. Spektroskopische Techniken wurden entwickelt, um zu versuchen, die frühe Detektion zu verbessern. Kontrastmittel werden verwendet, um den spektroskopischen Kontrast zwischen normalem und krankem Gewebe zu erhöhen. Die meisten Kontrastmittel benötigen eine systemische Verabreichung, um wirksam zu sein, was diese Gewebe einer Phototoxizität aussetzt. Eine nichtinvasive Verabreichung dieser Kontrastmittel würde bevorzugt.

[0012] Bis jetzt sind kommerzielle Anwendungen von fluoreszierenden Chelaten primär auf die Markierung von Proteinen und Antikörpern für Immunotests beschränkt [E.P. Diamandis, Clinica Chimica Acta 194, 19–50 (1990), US-Patent 5,312,922]. Produkte wie zum Beispiel FIAgen™ (CyberFluor Inc., Toronto, Ontario, Canada) sind verfügbar und verwenden das Europiumchelat von 4,7-bis(Chlorsulfonyl]-1,10-phenanthrolin-2,9-dicarbonsäure als Fluoreszenzmarkierung. Fluoreszierende Markierungen dieses Typs sind extrem empfindlich und können im subpicomolaren Bereich detektiert werden, wobei zeitaufgelöste Fluorometrie verwendet wird.

[0013] Eines der wichtigsten Merkmale diagnostischer Mittel ist, dass sie die Genauigkeit der Beurteilung eines Krankheitszustandes erhöhen müssen. Dies involviert am häufigsten Transportieren des diagnostischen Mittels an ein spezifisches Organ oder Weichteil, wo eine vermutete Abnormalität sein kann. Gegenwärtig erzielt das kovalente Binden eines kleinen Moleküls (das heißt eines diagnostischen Fragments) an ein großes Protein oder einen Antikörper (als "bifunktionell" bezeichnet) als Methode der Wahl viel Aufmerksamkeit, um eine Gewebespezifität zu erzielen.

[0014] Ein derartiges Beispiel eines bifunktionellen Moleküls ist bei Griffin, J.M.M. et al., "Simple, high yielding synthesis of trifunctional fluorescent lanthanide chelates (Einfache Synthese mit hoher Ausbeute von trifunktionellen fluoreszierenden Lanthanoidchelaten)", Tetrahedron Letters 42 (2001), Seiten 1–3 offenbart. Griffin offenbart einen Lanthanoidchelate bildenden Liganden, der auf dem Cyclenkern (1,4,7,10-Tetraazacyclododecankern) basiert, welcher eine einzige Carboxylgruppe zur Konjugation an eine biologisch aktive Spezies wie zum Beispiel einen Antikörper besitzt. Jedoch ist dieses Verfahren inhärent komplex und teuer, da es die Verwendung eines spezialisierten Antikörpers notwendig macht, um eine Gewebespezifität zu erzielen.

[0015] Daher wäre es vorteilhaft, ein diagnostisches Mittel mit einem kleinen Molekül zu verwenden, das sich in einem spezifischen Gewebe des Körpers ohne die Notwendigkeit zum Binden an ein Transportmolekül wie zum Beispiel an einen Antikörper konzentrieren würde. Falls ein stabiles fluoreszierendes Lanthanoidchelat eine Gewebespezifität zeigte, wäre es außerdem möglich, durch Bestrahlen mit einer geeigneten Lichtquelle, welche Weichteilschäden minimiert, die Anwesenheit des Chelats visuell zu bestimmen. Mögliche Anwendungen wären fluoreszenzgeleitete chirurgische Verfahren, in vivo-Abbildung von Knochen- oder Weichteilzellwachstum oder -morphologie und Untersuchungen des Gastrointestinaltraktes.

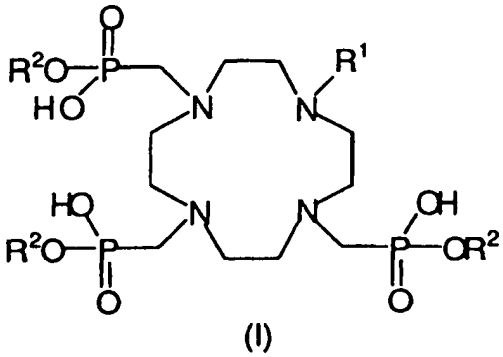
[0016] Fig. 1 ist das Absorptionsspektrum für das Europiumchelat der Formel (II), wobei R^1 Chinolyl ist, R^2 H ist und R^3 Cl ist.

[0017] Fig. 2 ist das Absorptionsspektrum für das Europiumchelat der Formel (II), wobei R^1 Chinolyl ist, R^2 H ist und R^3 Fluor ist.

[0018] Fig. 3 ist eine Photographie einer Hamsterbackentasche mit dem Europiumchelat der Formel (II), wobei R1 Chinolyl ist, R2 Ethyl ist und R3 Methyl ist.

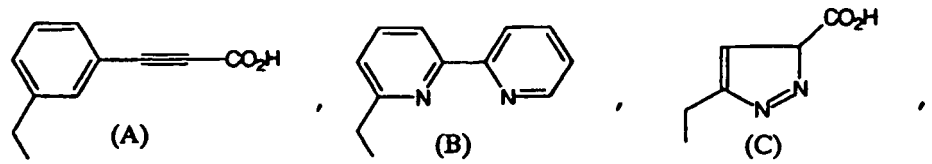
[0019] Die vorliegende Erfindung ist auf neue gewebespezifische Lanthanoid-, Terbium-, Europium- oder Dysprosiumchelate gerichtet, die als visuelle diagnostische Mittel verwendet werden können. Insbesondere werden die bevorzugten Chelate aus polyazamakrozyklischen Verbindungen der Formel (I) aufgebaut, welche einen Tetraazacyclododecan-trimethylenphosphonsäurekern und eine anhängende ligierende Gruppe enthalten, die als eine Antenne wirkt.

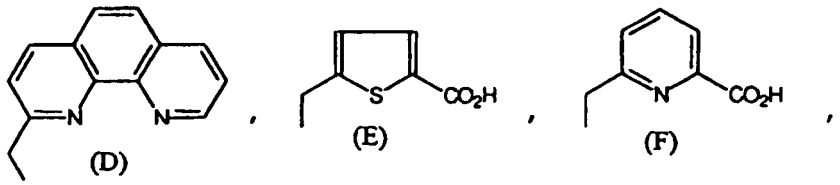
[0020] Die vorliegende Erfindung ist auf neue Verbindungen gerichtet, die tetraazamakrozyklische Verbindungen der Formel

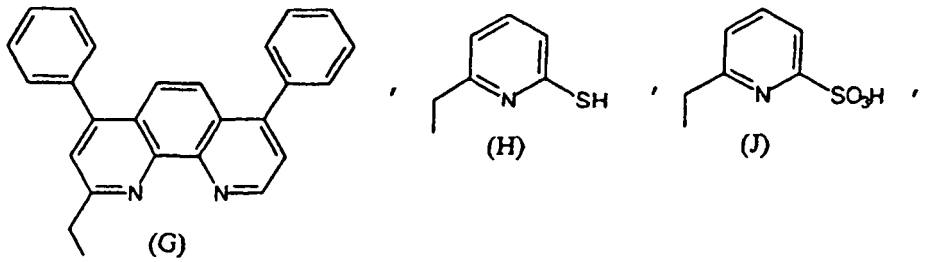


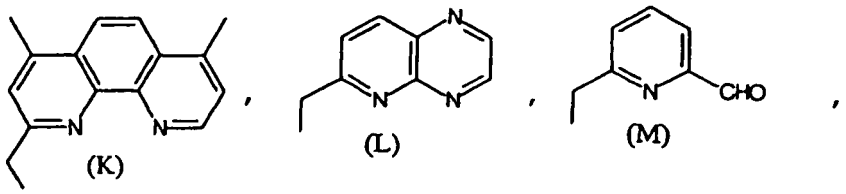
(I)

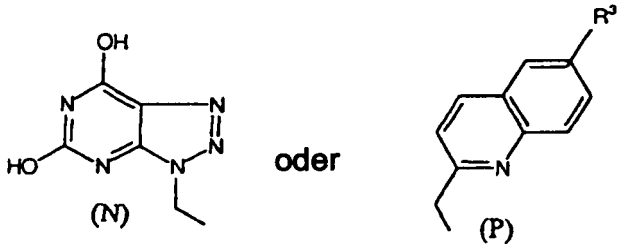
sind, wobei R^1





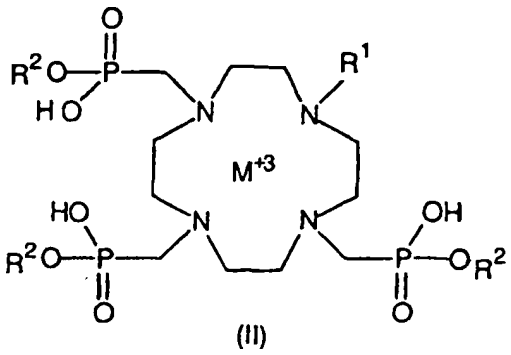




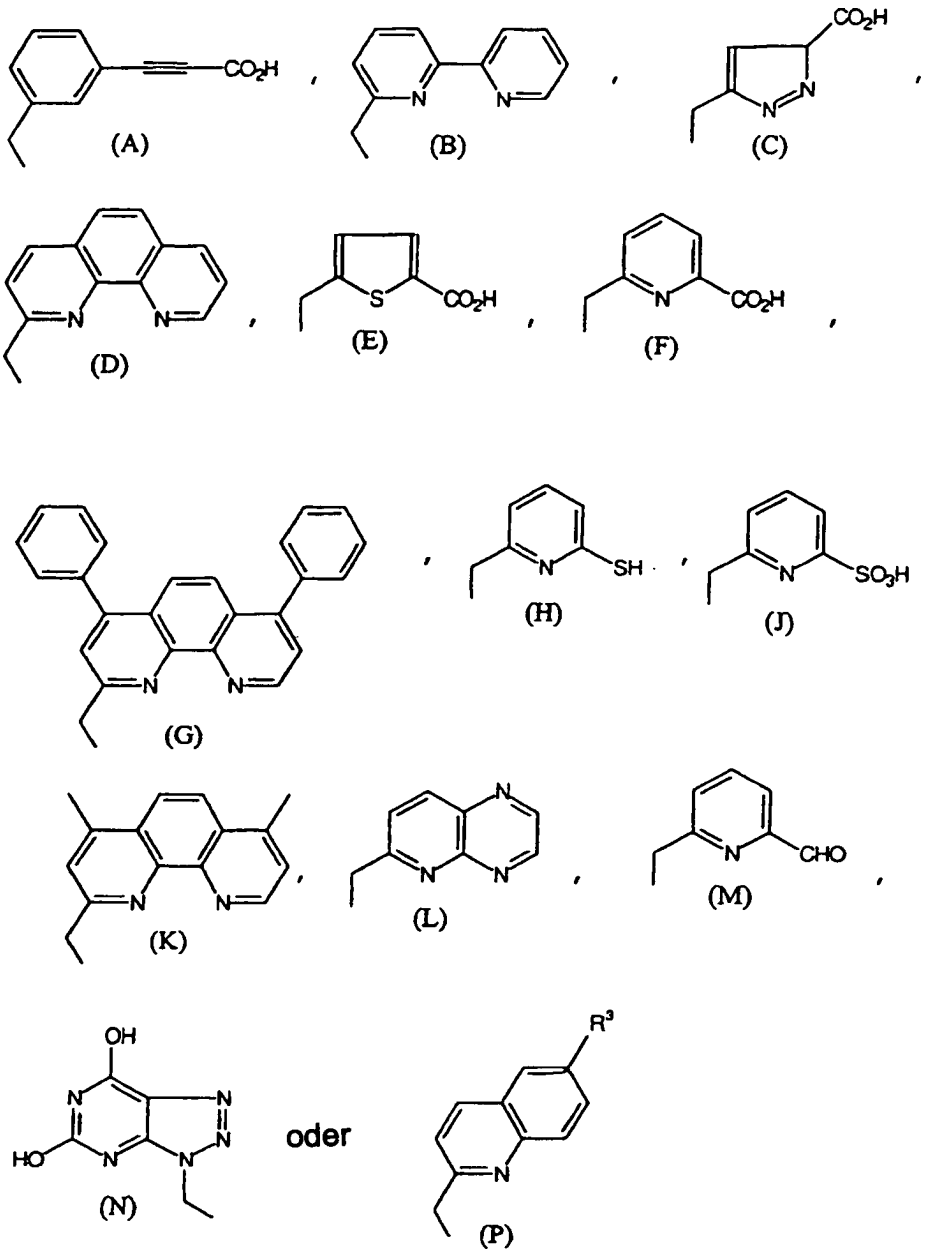


ist,
R^2 Methyl, Ethyl, Propyl, Butyl oder H ist, und
R^3 F, C_1-C_4-Alkyl, O(C_1-C_4-Alkyl) oder Cl ist, oder pharmazeutisch akzeptable Salze davon.

[0021] In einem anderen Aspekt ist die vorliegende Erfindung auf tetraazamakrozyklische Chelatverbindungen der Formel



gerichtet, wobei R^1



ist,
R^2 Methyl, Ethyl, Propyl, Butyl oder H ist, und
R^3 F, C_1-C_4-Alkyl, O(C_1-C_4-Alkyl) oder Cl ist,
M ein Metallion von Terbium (Tb), Europium (Eu), einem Lanthanoid (La) oder Dysprosium (Dy) ist, oder pharmazeutisch akzeptable Salze davon.

[0022] Pharmazeutische Lösungen der Chelate werden zur Herstellung von pharmazeutischen Formulierungen zur topischen Anwendung auf den gewünschten Bereich verwendet.

[0023] Vorteilhafterweise ist diese Lösung im Vergleich mit üblichen Kontrastmitteln verdünnt. Daher liegen diese Lösungen im Konzentrationsbereich von 0,001 M ungeachtet des Körpergewichts, wobei in konventionellen pharmazeutischen Formulierungen, wie zum Beispiel MRI-Formulierungen, die Konzentrationen der Lösungen im Konzentrationsbereich von 0,5 M im Gefäß für MRI-Lösungen liegt, wobei die Dosierung auf dem Körpergewicht basiert. Die erfindungsgemäßen Formulierungen werden auf die Oberfläche des Gewebes angewendet, zum Beispiel durch Spülen oder einen Tupfer. Für Oberflächenanwendungen ist das Körpergewicht kein bestimmender Faktor für die Dosierung.

[0024] Fluoreszenzabbildungen der Backentaschengewebe des Goldhamsters zeigen das Potential zur Verwendung der Lanthanoidchelate, um eine ortsgerichtete in vivo-Abbildung durchzuführen.

[0025] Die Genauigkeit spektroskopischer Abbildungen von Weichteilen in einem frühen Stadium kann durch die Verwendung von ortsgerichteten Molekülen (Kontrastmitteln), die sich in einem spezifischen Gewebe konzentrieren, signifikant erhöht werden.

[0026] Die Wahl des Metalls, das in den erfindungsgemäßen Chelaten verwendet wird, hängt von der gewünschten Farbe für die Fluoreszenzabbildung und den Ligandeneigenschaften ab. Die Verwendung von Terbium (Tb) oder Europium (Eu) ist als zentrales Metallion bevorzugt, um eine gewebespezifische Fluoreszenzsonde zu ermöglichen. Derivate dieses Typs wären für die visuelle Beurteilung von Gewebezuständen wertvoll, wie zum Beispiel die frühe Detektion von Mund- und Oesophaguskrebs und würden nicht von einer Proteinkonjugation abhängen, um ihr Ziel zu erreichen. Außerdem ist es denkbar, dass die Konzentration des aktiven Fluoreszenzmaterials viel höher sein könnte als im Falle von Immuntests, was die Detektion viel leichter macht.

[0027] Die vorliegenden Komplexe haben ein Anregungsband von 300 bis 340 nm, eine hohe Quanteneffektivität und Millisekunden-Relaxationslebensdauern, die ein Sammeln der Signale erlauben, nachdem sich die unverzügliche Gewebeautofluoreszenz gesenkt hat, und die ein Datensammeln außerhalb des Bereiches für normale Gewebefluoreszenz erlaubt. Die vorliegenden Chelate erlauben die Verwendung eines vereinfachten und preisgünstigen Abbildungssystems, besitzen ein verbessertes Absorptionsvermögen, haben größere Quanteneffektivitäten bei längeren UV-Wellenlängen (d.h. bei rotverschobener Anregung). Im Unterschied zu anderen Fluoreszenzchelaten, die leicht in wässrigen Medien gequencht werden oder bei einer gekürzten Wellenlänge vorliegen, die einen Weichteilschaden verursachen kann, degeneriert die visuelle Fluoreszenz in Wasser nicht, weshalb sie für in vivo-Abbildungsanwendungen für Tiere gut geeignet sind, und die Rotlichtwellenlängen bewirken eine geringere Wahrscheinlichkeit, Weichteilschäden zu verursachen. Außerdem gehören Chelate, die von dieser Familie makrozyklischer Liganden abgeleitet sind, zu den am meisten thermodynamisch und kinetisch inerten Lanthanoidkomplexen, was eine ausschlaggebende Überlegung für biologische Studien ist, worin Metallionentoxizität von großer Wichtigkeit ist.

[0028] Die Begriffe, die in den Formeln (I) und (II) und für diese Erfindung verwendet werden, sind weiterhin wie folgt definiert. „C_1-C_4-Alkyl" schließt sowohl geradkettige als auch verzweigtkettige Alkylgruppen ein. Ein „Tier" schließt ein warmblütiges Säugetier ein, vorzugsweise einen Menschen. Wie hier verwendet, bezieht sich „Komplex" auf einen Komplex der erfindungsgemäßen Verbindung, zum Beispiel Formel (I), der mit einem Metallion komplexiert ist, wobei wenigstens ein Metallatom chelatisiert oder sequestriert ist.

[0029] Wie hier verwendet, bedeutet „pharmazeutisch akzeptable Salze" beliebige Salze oder Mischungen von Salzen einer Verbindung von Formel (I) oder (II), die hinreichend nichttoxisch ist, so dass sie bei der Diagnose von Tieren, vorzugsweise Säugetieren, verwendbar sind. Daher sind die Salze in Übereinstimmung mit dieser Erfindung verwendbar. Repräsentanten dieser Salze, die durch Standardreaktionen aus sowohl organischen als auch anorganischen Quellen gebildet werden, schließen zum Beispiel Schwefel-, Salz-, Phosphor-, Essig-, Bernstein-, Zitronen-, Milch-, Malein-, Fumar-, Palmitin-, Chol-, Palm- (palmoic acid), Mucin-, Glutamin-, Glukonsäure-, d-Kampfer-, Glutar-, Glykol-, Phthal-, Wein-, Ameisen-, Laurin-, Stearin-, Salizyl-, Methansulfon-, Benzolsulfon-, Sorbin-, Pikrin-, Benzoe-, Zimtsäuren und andere geeignete Säuren ein. Ebenso sind Salze eingeschlossen, die durch Standardreaktionen aus sowohl organischen als auch anorganischen Quellen gebildet werden, wie zum Beispiel Ammonium oder 1-Desoxy-1-(methylamino)-D-glucitol, Alkalimetallionen, Erdalkalimetallionen und andere ähnliche Ionen. Besonders bevorzugt sind die Salze der Verbindungen der Formel (I) oder (II), wobei das Salz Kalium, Natrium oder Ammonium ist. Ebenso sind Mischungen der obigen Salze eingeschlossen.

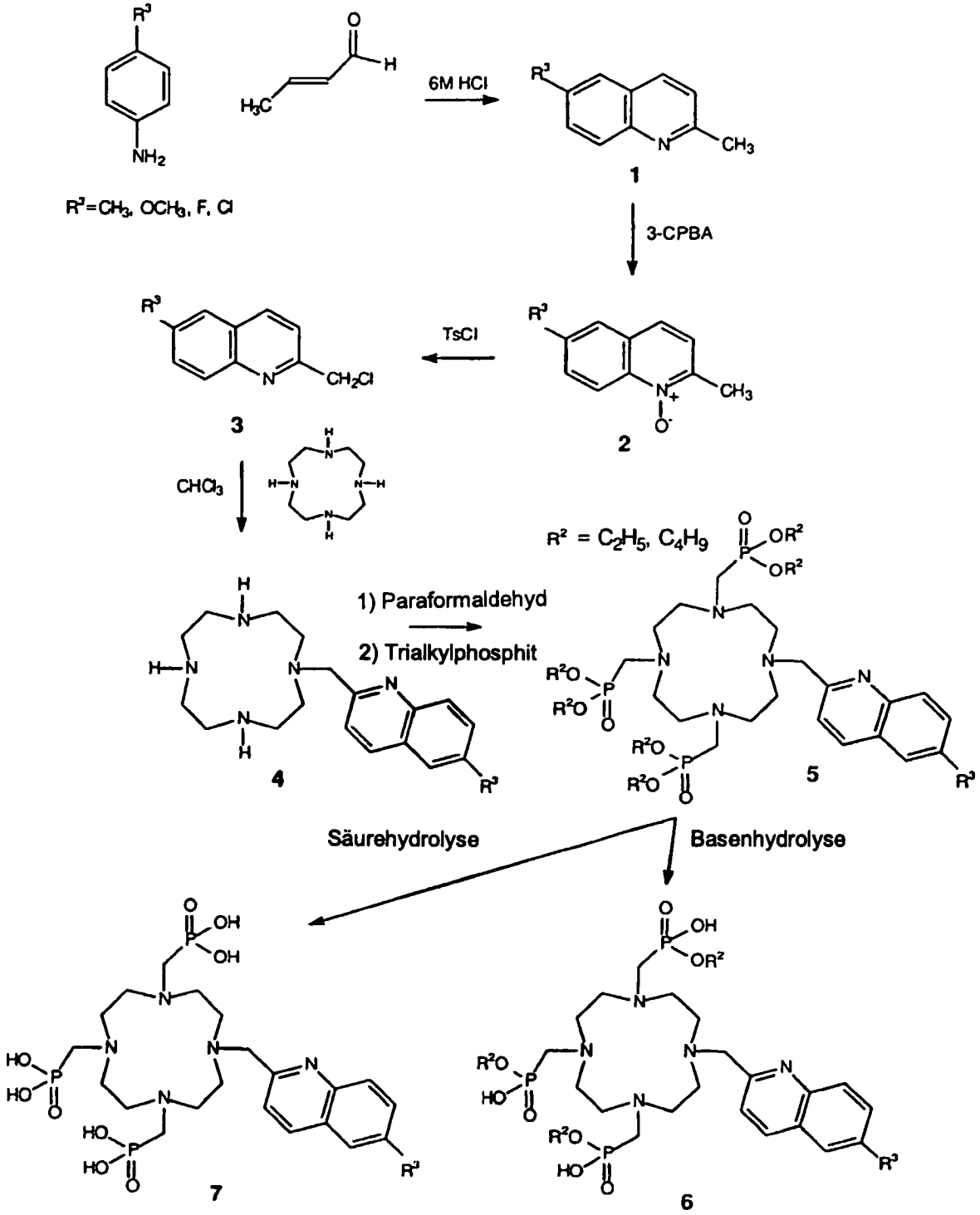
[0030] Natürlich kann die freie Säure der Verbindungen der Formel (I) oder (II) verwendet werden, ebenso die protonierte Form der Verbindungen, wenn zum Beispiel die Stickstoffatome protoniert sind, d.h. wenn das HCl-Salz gebildet wird.

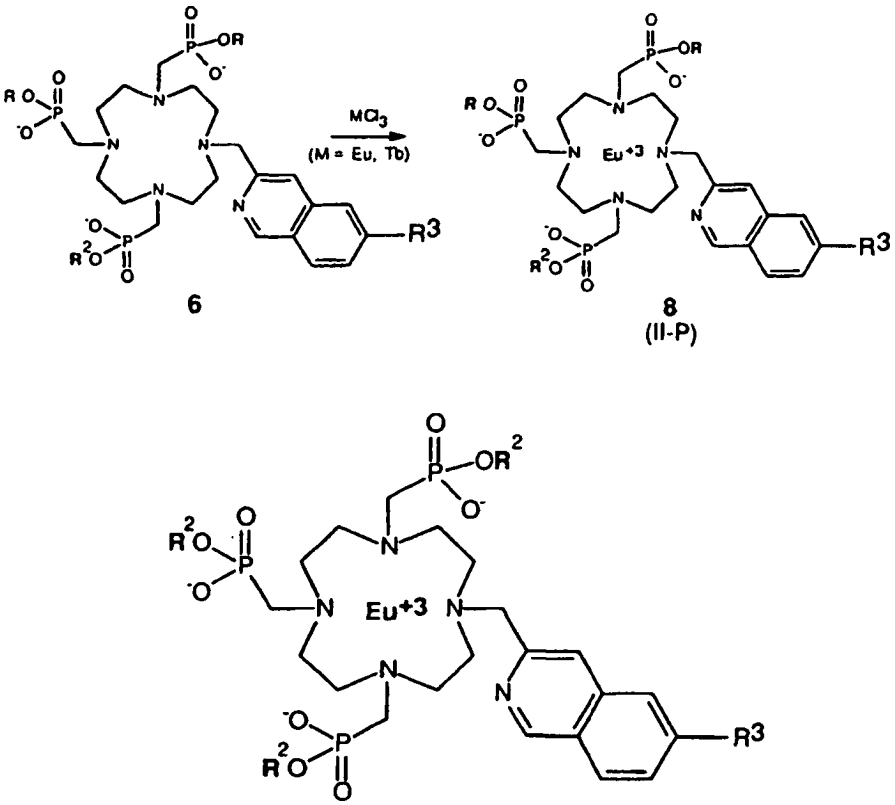
[0031] Die Komplexe werden durch Verfahren, die im Stand der Technik gut bekannt sind, hergestellt. Siehe daher zum Beispiel Chelating Agents and Metal Chelates (Chelatbildende Mittel und Metallchelate), Dwyer & Mellor, Academic Press (1964), Kapitel 7. Siehe ebenso Verfahren zur Herstellung von Aminosäuren in Synthetic Production and Utilization of Amino Acids (Synthetische Herstellung und Verwendung von Aminosäuren), (herausgegeben von Kameko, et al.) John Wiley & Sons (1974). Ein Beispiel für die Herstellung eines Komplexes involviert Reagierenlassen einer Bicyclopolyazamakrocyclophosphonsäure mit einem Metallion unter wässrigen Bedingungen bei einem pH von 5 bis 7. Der gebildete Komplex resultiert in einer stabilen Nuklidzusammensetzung, die zum Beispiel stabil gegenüber der Dissoziation des Nuklids vom Liganden ist.

[0032] Das folgende Schema 1 stellt eine detaillierte Diskussion der Herstellung der Komplexe dieser Erfin-

dung bereit.

Schema 1





[0033] Schema 1 zeigt eine Ausführungsform der Synthese zur Herstellung der 12-gliedrigen tetraazamakrozyklischen Struktur, welche einen Chinolinrest besitzt. Weitere Ausführungsformen sind in den Beispielen unten detailliert beschrieben. 4-substituiertes Anilin wird mit Butyraldehyd in 6 M Salzsäure zur Reaktion gebracht, um 2-methyl-6-substituiertes Chinolin (1) gemäß dem in J. Org. Chem. 42, 911 (1977) beschriebenen allgemeinen Verfahren zu bilden. Diese Chinolinverbindung wird dann mit 3-CPBA (3-Chlorperoxybenzosäure) zur Reaktion gebracht, um 2-methyl-6-substituiertes Chinolon-N-oxid (2) mit etwa 98 Gewichtsprozent zu liefern. Entschützen mit Tosylchlorid (oder einem ähnlichen Entschützungsmittel?) und gleichzeitige Methylchlorierung bildet 2-chlormethyl-6-substituiertes Chinolin (3) (35–75 Prozent, welches als ein Ausgangsmaterial dient). Die letzten beiden Schritte werden gemäß dem Verfahren von John Butera und Jehan Begli [J. Med. Chem. 34, 3212 (1991] durchgeführt.

[0034] Dieses Ausgangschinolin (3) wird dann mit Cyclen (1,4,7,10-Tetraazacyclododecan) in Chloroform bei Raumtemperatur zur Reaktion gebracht, um 1-[2-(7-substituiertes)-Methylenchinolinyl]-1,4,7,10-tetraazacyclododecan (4) zu bilden.

[0035] Die N-Alkylphosphonatester werden dann synthetisiert, indem die sekundären Amine des Makrozyklus' mit einem Trialkylphosphit (wie zum Beispiel Tributylphosphit oder Triethylphosphit) und Paraformaldehyd in Tetrahydrofuran (THF) zur Reaktion gebracht werden. Der resultierende Phosponatester 5 kann dann unter basischen Bedingungen hydrolysiert werden, um das 1-[2-(6-substituierte)-Methylenchinolinyl]-4,7,10-tris(methylenphosphonsäure-n-alkylester)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan 6 zu liefern, oder unter sauren Bedingungen, um das Phosphonsäurederivat 7 zu ergeben. Diese Ligandensysteme ergeben dann das gewünschte fluoreszierende Chelat, wenn sie mit dem geeigneten Lanthanoidion wie zum Beispiel Tb^{+3}, Eu^{+3} oder einem anderen Metallion wie zum Beispiel La, Y, Sc, Sm, Gd, Dy, Ho, Er, Tm, Yb und Lu komplexiert werden.

[0036] Die erfindungsgemäßen Komplexe werden bei einem molaren Liganden- zu Metallverhältnis von wenigstens 1:1, vorzugsweise von 1:1 bis 3:1, stärker bevorzugt von 1:1 bis 1,5:1, verabreicht. Ein großer Überschuss von Ligand ist nicht wünschenswert, da unkomplexierter Ligand für das Tier toxisch sein kann oder zu Herzstillstand oder hypokalzämischen Konvulsionen führen kann.

[0037] „Komplex" und „Chelat" werden so verwendet, dass sie ein Metallion mit einem Liganden der Formel (I), wie in Formel (II) gezeigt, bedeuten.

[0038] $LaCl_3$, $TbCl_3$ und $EuCl_3$ wurden als Hexahydrate von Aldrich Chemical gekauft.

[0039] Die erfindungsgemäßen Komplexe werden vorzugsweise als orale Lösungen verabreicht und sind als diagnostische Mittel auf die beschriebene Weise verwendbar. Diese Formulierungen können in Form eines Kits derartig vorliegen, dass die beiden Bestandteile (d.h. Ligand und Metall) rechtzeitig vor der Verwendung gemischt werden. Die Formulierungen benötigen normalerweise einen pharmazeutisch akzeptablen Träger, ob vorgemischt oder als ein Kit.

[0040] Einklagbare erfindungsgemäße Zusammensetzungen können entweder in Suspensions- oder in Lösungsform vorliegen. Bei der Herstellung geeigneter Formulierungen wird gewürdigt, dass im Allgemeinen die Wasserlöslichkeit des Salzes größer ist als die der Säureform. In Lösungsform ist der Komplex (oder wenn gewünscht, die getrennten Bestandteile) in einem physiologisch akzeptablen Träger gelöst. Derartige Träger umfassen ein geeignetes Lösungsmittel, wenn benötigt Konservierungsmittel wie zum Beispiel Benzylalkohol und Puffer. Verwendbare Lösungsmittel schließen zum Beispiel Wasser, wässrige Alkohole, Glykole und Phosphonat- oder Carbonatester ein. Derartige wässrige Lösungen enthalten nicht mehr als 50 Volumenprozent des organischen Lösungsmittels.

[0041] Einklagbare Suspensionen sind erfindungsgemäße Zusammensetzungen, die ein flüssiges Suspendiermedium mit oder ohne Adjuvantien als einen Träger benötigen. Das Suspendiermedium kann zum Beispiel wässriges Polyvinylpyrrolidon, inerte Öle wie zum Beispiel Pflanzenöle oder hochraffinierte Mineralöle oder wässrige Carboxymethylcellulose sein. Geeignete physiologisch akzeptable Adjuvantien können, falls sie notwendig sind, um den Komplex in Suspension zu halten, aus Verdickungsmitteln wie zum Beispiel Carboxymethylcellulose, Polyvinylpyrrolidon, Gelatine und Alginaten gewählt werden. Viele oberflächenaktive Substanzen sind ebenso als Suspendiermittel verwendbar, zum Beispiel Lecithin, Alkylphenol, Polyethylenoxidadukte, Napthalinsulfonate, Alkylbenzolsulfonate und Polyoxyethylensorbitanester.

[0042] Für Anwendungen, worin ein Gewebe mit dem fluoreszierenden Chelat vor der Untersuchung gespült wird, kann die Chelatlösung abhängig von den spezifischen Anforderungen in der Konzentration variieren. Typische Konzentrationen für eine topische Anwendung betragen 10^{-2} bis 10^{-7} M in einer geeigneten wässrigen Formulierung. Diese Konzentrationen sind drastisch niedriger als typische MRI-Kontrastmittel (0,5 M), welche durch iv-Injektion mit 0,1 mM/kg Körpergewicht verabreicht werden.

[0043] Die Komplexe und/oder Konjugate können für in vivo- oder in vitro-Verwendungen formuliert werden. Eine bevorzugte Verwendung der formulierten Konjugate ist die Diagnose von Krankheitszuständen (zum Beispiel Mund- oder Oesophaguskrebs, Colorectalkrebs oder Cervixkrebs) in Tieren, insbesondere in Menschen.

[0044] Diese Erfindung wird mit einem physiologisch akzeptablen Träger, Hilfsstoff oder Vehikel dafür verwendet. Die Verfahren zur Herstellung derartiger Formulierungen sind gut bekannt. Die Formulierungen können in Form einer Suspension, einer einklagbaren Lösung oder anderen geeigneten Formulierungen vorliegen. Physiologisch akzeptable Suspendiermedien, mit oder ohne Adjuvantien, können verwendet werden.

[0045] Eine „wirksame Menge" der Formulierung wird zur Diagnose verwendet. Vorteilhafterweise kann die Formulierung topisch angewendet werden, was nichtinvasiv im Vergleich zu injizierbaren Formulierungen ist. Die Dosis variiert abhängig von der Krankheit und den physikalischen Parametern des Tieres, wie zum Beispiel der Oberfläche des zu untersuchenden Gewebes, der Detektierbarkeit der Abbildung basierend auf der verwendeten Ausrüstung und der Aufnahmerate des Chelats in das kranke Gewebe. Dieser letzte Punkt kann durch die Chelatkonzentrationen beeinflusst werden und wird basierend auf dem Krankheitstyp optimiert. Es wird ebenso in Erwägung gezogen, dass zur in vivo-Diagnostik erfindungsgemäße Formulierungen verwendet werden.

[0046] Mit den Komplexen der Formel (II), die mit den Verbindungen der Formel (I) dieser Erfindung gebildet werden, werden Abbildungen unter Verwendung eines Verfahrens zur Emissionsdetektion hergestellt, welches ein mikroskopisches Interface mit Fernabbildungstechnologie kombiniert, um in vivo-Abbildungen zu ermöglichen. Geeignete Verfahren für ein derartiges Abbilden sind in den US-Patenten Nr. 5,928,627 und 5,507,287 beschrieben.

[0047] Die erfindungsgemäßen Chelate sind sehr gut für topische Anwendungen auf exponiertem Gewebe wie zum Beispiel dem Mundraum, der Haut und Cervixgewebe geeignet. Für diese Anwendungstypen könnten die Chelate durch Verwendung einer einfachen fokussierten UV-Lichtquelle angeregt werden.

[0048] Ohne an eine Theorie gebunden zu sein, wird geglaubt, dass die vorteilhaften Ergebnisse der vorliegenden Erfindung erhalten wurden, weil allen erfindungsgemäßen Chelaten gemeinsam ist, dass das Kation

an der apikalen Position oberhalb des 12-gliedrigen Makrozyklus' positioniert ist und an dieser Stelle durch eine ionische Interaktion mit einer Phosphonsäure-ligierenden Gruppe gehalten wird. Diese einzigartige Kombination von funktionalisierten Stickstoffpositionen und ligierenden Gruppen innerhalb des makrozyklischen Rahmens ermöglicht chemische Modifikationen, die zu einer Gewebeselektivität führen.

[0049] Die Fluoreszenz von Lanthanoidsalzen wie zum Beispiel La, Tb, Eu und Dy in wässriger Lösung ist sehr schwach, weil die Ionen die notwendige Energie nicht effizient absorbieren. Jedoch kann die Fluoreszenz dieser Ionen dramatisch erhöht werden, wenn das Metall mit einem geeigneten organischen Liganden komplexiert ist.

[0050] In diesen einzigartigen Komplexen absorbiert der Ligand der Formel (I) UV-Strahlung und wird vom Grundzustand (S_0) zu einem angeregten Zustand (S_1) angeregt. Sobald der Ligand beginnt, in seinen anfänglichen Grundzustand zurückzukehren, wird ein Teil der Energie vom Tripletzustand des Liganden auf eine geeignete 4f-Energiestufe des Lanthanoidions übertragen. Wenn das Ion Energie vom Tripletzustand des Liganden erhält, kommt es in einen Resonanzzustand und kann eine Strahlungstransition durchmachen, was zu der charakteristischen Linienemission des Metallions (Ionenfluoreszenz) führt. In diesen Chelatstrukturen wirkt der Ligand im Wesentlichen als eine Antenne zur Absorption von Energie, welche auf das Metallion übertragen wird und in Form von sichtbarem Licht reemittiert wird. Um die Interferenz zu minimieren, ist es ebenso vorteilhaft, einen Liganden zu haben, welcher Energie bei einer signifikant unterschiedlichen Wellenlänge absorbiert, als das Metallion emittiert (Stoke-Verschiebung).

[0051] Es wurde über zahlreiche Fluoreszenzchelate berichtet. Eine große Mehrheit dieser Chelate ist nur in wasserfreien Medien wirksam, weil die Fluoreszenz durch Wasser gequencht wird. Die erfindungsgemäßen Chelate sind für biologische Anwendungen aufgrund ihrer Fähigkeit zur Bildung stabiler fluoreszierender Chelate in einer wässrigen Umgebung weit überlegen. Die einzigartige Positionierung der Pyridinfunktionalität, entweder als Teil des makrozyklischen Rings oder als anhängende Gruppe, ermöglicht einen effizienten Energietransfer zu dem Metallion und erhöht ebenso die Gesamtstabilität des Chelats.

[0052] Die Erfindung wird weiterhin durch Betrachtung der folgenden Beispiele verdeutlicht, wobei beabsichtigt ist, dass sie für die vorliegende Erfindung rein exemplarisch sind.

Beispiele

[0053] Für die folgenden Beispiele beziehen sich die Nummern in Klammern, die nach dem chemischen Namen erscheinen, auf Strukturnummern, die unterhalb der entsprechenden Strukturen in Schema 1 angegeben sind.

ALLGEMEINES EXPERIMENTELLES

[0054] NMR-Daten wurden auf einem Bruker-Spektrometer erhalten, das bei 250 Mhz arbeitete. Proben wurden entweder in CDC_3 oder D_2O mit Dioxan vorbereitet. Über alle angegebenen chemischen Verschiebungen wird relativ zu TMS (Tetramethylsilan) oder 1,4-Dioxan als einer externen Referenz berichtet.

[0055] Absorptionsspektren für die Liganden und Chelate wurden auf einem Varian/Cary 1-Spektrophotometer mit ultraviolettem/sichtbarem Licht erhalten.

[0056] Alle Chemikalien wurden von der Aldrich Chemical Company (Chemische Gesellschaft Aldrich) gekauft und ohne weitere Reinigung verwendet.

[0057] Alle Anteile und Prozentwerte sind auf das Gewicht bezogen, wenn nicht anders spezifiziert.

AKRONYMTERMINOLOGIE FÜR CHELATE

[0058] Tabelle A stellt die Akronyme dar, die in den folgenden Beispielen verwendet werden, um Chelatbildner zu repräsentieren, die die aufgeführten anhängenden Gruppen haben. Für alle Chelatbildner, die in Tabelle A aufgeführt sind, ist R^1 Chinolin (P in Formeln (I) und (II)).

Tabelle A

Beispiel	R2	R3	Chelat	Akronym
10	C_2H_5	CH_3	Europium-ChinolylMethyl (zyklischer TriPhosphonatEthylester)	Eu-CM (ZTPE)
11	C_4H_9	CH_3	Europium-ChinolylMethyl (zyklischer TriPhosphonatButylester)	Eu-CM (ZTPB)
12	H	CH_3	Europium-ChinolylMethyl (zyklische TriPhosphonsäure)	Eu-CM (ZTPH)
13	H	Cl	Europium-ChinolylMethyl (zyklische TriPhosphonsäure)	Eu-CCl (ZTPH)
14	H	F	Europium-ChinolylMethyl (zyklische TriPhosphonsäure)	Eu-CF (ZTPH)

Ausgangsmaterialen

[0059] Die Beispiele 1-3 beschreiben die Herstellung der anhängenden 6-methylsubstituierten Chinolingruppe. Die 6-Chlor-, 6-Methoxy- und 6-Fluoranaloga werden auf ähnliche Weise hergestellt, indem das geeignete 6-Chlor-, 6-Methoxy- oder 6-Fluoranilin anstelle des Paratoluidins in Schema 1 substituiert wird. Die nachfolgende Liganden- und Chelatsynthese für diese anderen Derivate ist zu dem folgenden Beispiel identisch.

Beispiel 1: Synthese von 2,6-Dimethylchinaldin (1, R^3=Methyl)

[0060] Paratoluidin (10 g, 0,0933 mol) wurde in 100 ml 6 M HCl gelöst und auf 90 °C unter kräftigem Rühren erwärmt. Crotonaldehyd (6,62 g, 0,0945 mol) wurde tropfenweise zu der Mischung über eine Dauer von sechs Stunden hinzugefügt, nach denen man die Reaktion unter Wärme für weitere zwei Stunden rühren ließ. Man ließ die fertige Reaktion auf Raumtemperatur abkühlen. $ZnCl_2$ (12,3 g, 0,0933 mol) wurde dann zu der Lösung hinzugefügt, die kräftig für 30 Min gerührt wurde. Die Lösung wurde dann auf 0 °C abgekühlt und für weitere 15 Minuten gerührt. Das Präzipitat wurde dann vakuumfiltriert und mit gekühlter 3 M HCl gewaschen. Das Präzipitat wurde dann in einen Becher überführt, mit Isopropanol für 30 Minuten gerührt, gefiltert, mit weiterem Isopropanol und dann schließlich mit gekühltem Ether gewaschen. Der Feststoff wurde dann in einen Becher überführt, zu dem 100 ml Wasser hinzugefügt wurden, und dann wurde unter Rühren auf 0 °C gekühlt. 30 ml NH_4OH (aq) wurde zu der Lösung hinzugefügt, und man ließ 10 Minuten rühren. Die resultierende Mischung wurde mehrere Male mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten Dichlormethanschichten wurden unter Verwendung von $MgSO_4$ getrocknet und abgedampft, um 7,2 g (49 Prozent Ausbeute) eines dunkelgelben Feststoffes hervorzubringen. Der Feststoff wurde in Hexanen umkristallisiert, um einen gelben Feststoff herzustellen. H^1 NMR ($CDCl_3$): δ 2,50 (s, 3H), 2,70 (s, 3H), 7,23–7,45 (m, 3H), 7,94–7,99 (m, 2H).

Beispiel 2: Synthese von 2.6-Dimethylchinaldin-N-oxid (2, R^3=Methyl)

[0061] Zu einer gerührten Lösung von 2,6-Dimethylchinaldin (1) (5 g, 0,0318 mol) in 1,2-Dichlorethan (130 ml) wurde 3-CPBA (3-Chlor-peroxybenzosäure) (7,43 g mit 72 Prozent Aktivität, 0,0310 mol) hinzugefügt. Die Reaktion wurde dann für 24 Stunden auf 40 °C gewärmt. Man ließ die fertige Reaktionsmischung auf Raumtemperatur abkühlen, konzentrierte, und 10 Prozent K_2CO_3 und eine minimale Menge Ethylacetat wurden, um eine Zweiphasenmischung herzustellen. Ein Präzipitat wurde dann in beiden Schichten gebildet und wurde filtriert, mit Wasser gewaschen, um Spuren von K_2CO_3 zu entfernen und getrocknet, um 4,67 g (85 Prozent) hervorzubringen. H^1 NMR ($CDCl_3$): δ 2,52 (s, 3H), 2,66 (s, 3H), 7,28–7,56 (m, 4H), 8,70–8,79 (m, 1H).

Beispiel 3: Synthese von 2-(Chlormethyl)-6-methylchinolin (3 R^3=Methyl)

[0062] Zu einer gerührten Lösung von p-Toluolsulfonylchlorid (6,19 g, 0,0325 mol) in Dichlorethan (75 ml) wurde 2,6-Dimethylchinaldin-N-oxid (2) (5 g, 0,0289 mol) unter N_2 hinzugefügt. Die Reaktionsmischung wurde dann auf 100 °C für 24 Stunden gewärmt, abgekühlt, konzentriert und mit 10-prozentigem K_2CO_3 und Ethylacetat extrahiert. Die organische Schicht wurde mit $MgSO_4$ getrocknet, konzentriert und auf einer kleinen Silica-Flashsäule (2:1 Dichlormethan:Hexane) gereinigt. Der resultierende gelbe Feststoff wurde dann in Hexa-

nen umkristallisiert, um 3,31 g (60 Prozent) eines weißen Feststoffs hervorzubringen. H^1 NMR ($CDCl_3$): δ 2,50 (s, 3H) 4,80 (s, 2H), 7,40–7,50 (m, 2H), 7,58–7,61 (d, 1H), 8,02–8,99 (m, 1H), 8,11–8,14 (d, 1H).

Ligandensynthese

Beispiel 4: Synthese von N-(6-Methyl-2-chinolylmethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan (4, R^1=Chinolyl, R^3=Metyl)

[0063] Zu einer gerührten Lösung von Cyclen (3,52 g, 0,0204 mol) in Chloroform (525 ml) wurde 2-(Chlormethyl)-6-methylchinolin (3) (2 g, 0,0104 mol) hinzugefügt. Man ließ die Reaktion rühren, bis sie fertig war, wie durch TLC bestimmt wurde, konzentrierte und reinigte auf Silica, wobei ein Gradientenelutionssystem verwendet wurde, welches mit 50:1 $CHCl_3$:MeOH begann, 150:4:1 $CHCl_3$:MeOH:NH_4OH, 100:4:1, 50:4:1 und schließlich mit 20:4:1, um 2,54 g (75 Prozent) eines blassgelben Öls hervorzubringen. H^1 NMR ($CDCl_3$): δ 2,35–3,15 (m, 22H), 3,87 (s, 2H), 7,33–7,42 (m, 2H), 7,58–7,62 (d, 1H), 7,94–8,07 (m, 2H).

Beispiel 5: Synthese von N-(6-Fluor-2-chinolylmethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan (4, R^1=Chinolyl, R^3=F)

[0064] Zu einer gerührten Lösung von Cyclen (3,52 g, 0,0204 mol) in Chloroform (525 ml) wurde 2-(Chlormethyl)-6-fluorchinolin (2 g, 0,0102 mol) hinzugefügt. Man ließ die Reaktion rühren, bis sie fertig war, wie durch TLC bestimmt wurde, konzentrierte und reinigte auf Silica, wobei ein Gradientenelutionssystem verwendet wurde, welches mit 50:1 $CHCl_3$:MeOH begann, 150:4:1 $CHCl_3$:MeOH:NH_4OH, wiederholt bei 100:4:1 $CHCl_3$:MeOH:NH_4OH, nochmals wiederholt bei 50:4:1 $CHCl_3$:MeOH:NH_4OH, und schließlich mit 20:4:1 $CHCl_3$:MeOH:NH_4OH, um 2,54 g (75 Prozent) eines blassgelben Öls hervorzubringen, das sich bei Stehen zu einem cremefarbenen Feststoff verfestigte. H^1 NMR ($CDCl_3$): δ 2,35–3,15 (m, 19H), 3,87 (s, 2H), 7,33–7,42 (m, 2H), 7,58–7,62 (d, 1H), 7,94–8,07 (m, 2H).

Beispiel 6: Synthese von N-(6-Methyl-2-chinolylmethyl)-N',N'',N'''-tris(methylenphosphonsäure)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan (7, R^1=Chinolyl R^2=H, R^3=Methyl)

[0065] Zu einer gerührten Lösung von N-(6-Methyl-2-chinolylmethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan (4) (1 g, 0,00305 mol) in trockenem THF (50 ml) unter N_2 wurde Paraformaldehyd (0,276 g, 0,00918 mol) hinzugefügt. Man ließ die Reaktion für drei Stunden bei Raumtemperatur rühren. Tributylphosphit (2,30 g, 0,00918 mol) wurde dann zu der Mischung langsam hinzugefügt, und man ließ rühren, bis die Lösung vollständig klar wurde. Die fertige Reaktionsmischung wurde konzentriert und unter Hochvakuum für 24 Stunden getrocknet, um ein blassgelbes Öl hervorzubringen. Das resultierende Öl wurde in 6 M HCl (50 ml) gelöst und unter Rühren für vier Tage bis zu einem leichten Reflux gewärmt. Man ließ die Lösung abkühlen, und überschüssiges HCl wurde durch azeotrope Destillation mit Wasser entfernt, um einen blassgelben Feststoff hervorzubringen. Das Produkt wurde dann, falls notwendig, durch Umkristallisieren mit wasserfreiem Isopropylalkohol weiter gereinigt, um 2,17 g (90 Prozent) eines weißen Feststoffes hervorzubringen. Die Verbindung wurde in ihrer vollständig protonierten Form isoliert. H^1 NMR (D_2O): δ 2,45–3,80 (br m, 25H), 4,07 (s, 2H), 7,67–7,74 (m, 2H), 7,87–7,91 (d, 1H), 8,18–35 (qr 1H), 8,79–8,84 (d, 1H).

Beispiel 7: Synthese von N-(6-Methyl-2-chinolylmethyl)-N',N'',N'''-tris(methylenphosphonsäurebutylester)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan (6, R^1=Chinolyl, R^2=C_4H_2, R^3=Methyl)

[0066] Zu einer gerührten Lösung von N-(6-Methyl-2-chinolylmethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan (4) (1 g, 0,00305 mol) in trockenem THF (50 ml) unter N_2 wurde Paraformaldehyd (0,276 g, 0,00918 mol) hinzugefügt. Man ließ die Reaktion für drei Stunden bei Raumtemperatur rühren. Tributylphosphit (2,30 g, 0,00918 mol) wurde dann zu der Mischung hinzugefügt, und man ließ rühren, bis die Lösung vollständig klar wurde. Die fertige Reaktionsmischung wurde konzentriert und unter Hochvakuum für 24 Stunden getrocknet, um ein blassgelbes Öl hervorzubringen. Das Öl wurde dann für vier Tage mit 27 Äquivalenten KOH refluxiert, in 20 ml H_2O mit ausreichend Dioxan gelöst, um Löslichkeit zu erzielen. Das resultierende Mischungsvolumen wurde dann unter Vakuum reduziert, um ein dickes Öl herzustellen. Das Öl wurde dann mit einer Reihe von Methanol/Chloroformlösungen mit ansteigender Chloroformkonzentration unter Filtrieren und Entfernen des Lösungsmittels gewaschen. Das resultierende Öl wurde dann in einer minimalen Menge Chloroform gelöst, und Acetonitril wurde hinzugefügt, bis die Lösung trübe wurde. Man ließ die Mischung stehen, um das reine Produkt zu präzipitieren, welches dann filtriert, in Wasser gelöst und lyophilisiert wurde, um 0,541 g (20 Prozent) eines leicht gelben Feststoffes herzustellen. H^1 NMR (D_2O): δ 0,75–0,85 (m, 9H), 1,18–1,45 (m, 6H), 1,48–1,55 (m, 6H), 1,91–3,10 (br m, 19H), 3,65–3,82 (br, 12H), 4,10–4,21 (br, 2H), 7,32–7,41 (m, 1H), 7,50–7,61 (br, 1H), 7,80–7,88 (d, 1H), 7,92–8,01 (m, 1H), 8,20–8,31 (d, 1H).

Beispiel 8: Synthese von N-(6-Methyl-2-chinolylmethyl)-N',N'',N'''-tris(methylenphosghonsäureethylester)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan (6, R^1=Chinolyl, R^2=C_2H_5 R^3=Methyl)

[0067] Zu einer gerührten Lösung von N-(6-Methyl-2-chinolylmethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan (4) (1 g, 0,00305 mol) in trockenem THF (50 ml) unter N_2 wurde Paraformaldehyd (0,276 g, 0,00918 mol) hinzugefügt. Man ließ die Reaktion für drei Stunden bei Raumtemperatur rühren. Triethylphosphit (1,524 g, 0,00918 mol) wurde dann zu der Mischung hinzugefügt, und man ließ rühren, bis die Lösung vollständig klar wurde. Die fertige Reaktionsmischung wurde konzentriert und unter Hochvakuum für 24 Stunden getrocknet, um ein blassgelbes Öl hervorzubringen. Das Öl wurde dann für vier Tage mit 27 Äquivalenten KOH refluxiert, in 20 ml H_2O mit ausreichend Dioxan gelöst, um Löslichkeit zu erzielen. Das resultierende Mischungsvolumen wurde dann unter Vakuum reduziert, um ein dickes Öl herzustellen. Das Öl wurde dann mit einer Reihe von Methanol/Chloroformlösungen mit ansteigender Chloroformkonzentration unter Filtrieren und Entfernen des Lösungsmittels gewaschen. Das resultierende Öl wurde dann in einer minimalen Menge Chloroform gelöst, und Acetonitril wurde hinzugefügt, bis die Lösung trübe wurde. Man ließ die Mischung stehen, um das reine Produkt zu präzipitieren, welches dann filtriert, in Wasser gelöst und lyophilisiert wurde, um 0,520 g (21 Prozent) eines leicht gelben Feststoffes herzustellen. H^1 NMR (D_2O): δ 0,87 (t, 6H), 1,07 (t, 3H), 2,45 (s, 3H), 2,49–3,09 (br m, 25H), 3,47 (p, 4H), 3,76 (p, 2H), 3,89 (s, 2H), 7,55 (m, 3H), 7,76 (d, 1H), 8,15 (d, 1H).

Beispiel 9: Synthese von N-(6-Fluor-2-chinolylmethyl)-N',N'',N'''-tris(methylenphosphonsäure)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan (7, R^1=Chinolyl (II-P), R^3=F)

[0068] Zu einer gerührten Lösung von N-(6-Fluor-2-chinolylmethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan (1 g, 0,00302 mol) in trockenem THF (50 ml) unter N_2 wurde Paraformaldehyd (0,298 g, 0,00942 mol) hinzugefügt. Man ließ die Reaktion für drei Stunden bei Raumtemperatur rühren. Tributylphosphit (2,48 g, 0,00942 mol) wurde dann zu der Mischung langsam hinzugefügt, und man ließ rühren, bis die Lösung vollständig klar wurde. Die fertige Reaktionsmischung wurde konzentriert und unter Hochvakuum für 24 Stunden getrocknet, um ein blassgelbes Öl hervorzubringen. Das resultierende Öl wurde in 6 M HCl (50 ml) gelöst und unter Rühren für vier Tage bis zu einem leichten Reflux gewärmt. Man ließ die Lösung abkühlen, und überschüssiges HCl wurde durch azeotrope Destillation mit Wasser entfernt, um einen blassgelben Feststoff hervorzubringen. Das Produkt wurde dann, falls notwendig, durch Umkristallisieren mit wasserfreiem Isopropylalkohol weiter gereinigt, um 2,17 g (90 Prozent) eines weißen Feststoffes hervorzubringen. Die Verbindung wurde in ihrer vollständig protonierten Form isoliert. H^1 NMR (D_2O): δ 2,45–3,80 (br m, 22H), 4,07 (s, 2H), 7,67–7,74 (m, 2H), 7,87–7,91 (d, 1 H), 8,18–35 (qr 1H), 8,79–8,84 (d, 1H).

Chelatsynthese

Beispiele 10 und 11: Herstellung von Eu-CM (ZTPE) und Eu-CM (ZTPB)

[0069] Das Kaliumsalz von N-(6-Methyl-2-chinolylmethyl)-N',N'',N'''-tris(methylenphosphonsäurebutylester (R^2=n-butyl) oder -ethylester (R^2=Ethyl))-1,4,7,10-tetraazacyclododecan (6) (300 mg) wurde in 100 ml destilliertem Wasser gelöst. Der pH der Lösung, welcher anfangs um 10,5 lag, wurde dann unter Verwendung von verdünnter Salzsäure auf 6,5 eingestellt. Europiumchlorid-Hexahydrat (1 Äquivalent) wurde in 50 ml destilliertem Wasser gelöst und tropfenweise unter Rühren zu der Ligandenlösung hinzugefügt. Als der pH begann abzufallen, wurde er mit einer verdünnten Kaliumhydroxidlösung um sechs gehalten. Das Hinzufügen von Kaliumhydroxid wurde beendet, nachdem das gesamte Europiumsalz hinzugefügt wurde und als der pH sich um 6,4 einstellte. Die Lösung wurde dann lyophilisiert, in Chloroform wieder aufgelöst und durch Celite gefiltert. Das resultierende Filtrat wurde dann konzentriert, um einen glasigen Feststoff zu bilden. Der Feststoff wurde dann in Wasser aufgenommen und durch einen Mikrofilter filtriert, um $Eu(OH)_3$ zu entfernen, und lyophilisiert, um einen flockigen weißen Feststoff herzustellen.

Beispiel 12: Herstellung von Eu-CM (ZTPH)

[0070] Das Hydrochloridsalz von N-(6-Methyl-2-chinolylmethyl)-N',N'',N'''-tris(methylenphosphonsäure)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan (7) (300 mg) wurde in 100 ml destilliertem Wasser gelöst. Der pH der Lösung, welcher anfangs um 4,5 lag, wurde dann unter Verwendung von verdünntem Kaliumhydroxid auf 6,5 eingestellt. Europiumchlorid-Hexahydrat (1 Äquivalent) wurde in 50 ml destilliertem Wasser gelöst und tropfenweise unter Rühren zu der Ligandenlösung hinzugefügt. Als der pH begann abzufallen, wurde er mit verdünntem Kaliumhydroxid um sechs gehalten. Das Hinzufügen von Kaliumhydroxid wurde beendet, nachdem das gesamte Europiumsalz hinzugefügt wurde und als der pH sich um 6,4 einstellte. Die Lösung wurde dann lyophilisiert. Der resultierende Feststoff wurde dann in Wasser aufgenommen und filtriert, um $Eu(OH)_3$ zu entfer-

nen, und nochmals lyophilisiert, um einen flockigen weißen Feststoff herzustellen.

Beispiel 13: Herstellung von Eu-CCl (ZTPH).

[0071] 1-[2-(Methylen)-6-chlorchinolinyl-4,7,10-tri(methylenphosphonsäure)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan (6) (54 mg, 0,1 mmol) wurde anfangs in entionisiertem Wasser (1 ml) gelöst, um eine wässrige Lösung mit pH = 1,3 zu ergeben. Europiumchlorid-Hexahydrat (37 mg, 0,1 mmol) wurde dann in Wasser (1 ml) gelöst und in einer Portion zu der Ligandenlösung unter kontinuierlichem Rühren (pH = 1,4) hinzugefügt. Natriumhydroxid (0,1 N) wurde dann in 50 µl-Portionen hinzugefügt, bis ein pH = 5,5 gehalten wurde. Die Komplexierung wurde durch Umkehrphasen-HPLC überwacht, wobei mit Methanol/Wasser (80:20) eluiert wurde. Die Lösung wurde dann durch ein 0,2 µm-Filter filtriert und gefriergetrocknet, um den Komplex als einen flockigen weißen Feststoff zu ergeben, welcher eine leuchtend grüne Emission zeigte, wenn er mit einer UV-Lampe angeregt wurde. Die Komplexierung wurde durch HPLC beurteilt, und die Ausbeute war quantitativ.

[0072] Absorptionsspektren wurden wie in Fig. 1 dargestellt erzeugt.

Beispiel 14: Herstellung von Eu-CF (ZTPH)

[0073] Das Kaliumsalz von N-(6-Fluor-2-chinolylmethyl)-N',N'',N'''-tris(methylenphosphonsäurebutylester)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan (300 mg, $3{,}34X10^{-4}$ mol) wurde in 100 ml destilliertem Wasser gelöst. Der pH der Lösung, welcher anfangs um 10,5 lag, wurde dann unter Verwendung einer verdünnten Salzsäure auf 6,5 eingestellt. Europiumchlorid-Hexahydrat (123 mg, $3{,}34X10^{-4}$ mol) wurde in 50 ml destilliertem Wasser gelöst und zu der Butyl-Halbesterlösung tropfenweise unter Rühren hinzugefügt. Als der pH begann abzufallen, wurde er mit einer verdünnten Kaliumhydroxidlösung um sechs gehalten. Das Hinzufügen von Kaliumhydroxid wurde beendet, nachdem das gesamte Europiumsalz hinzugefügt wurde und als der pH sich um 6,4 einstellte. Die Lösung wurde dann lyophilisiert, in Chloroform wieder aufgelöst und durch Celite gefiltert. Das resultierende Filtrat wurde dann konzentriert, um einen glasigen Feststoff zu bilden. Der Feststoff wurde dann in Wasser aufgenommen und durch einen Mikrofilter filtriert, um $Eu(OH)_3$ zu entfernen, und lyophilisiert, um einen flockigen weißen Feststoff herzustellen. Absorptionsspektren wurden wie in Fig. 2 dargestellt erzeugt.

Abbilden

Beispiel 15: Abbildung im Hamsterbackenmodell

[0074] Bösartige Läsionen in der Backe des syrischen Hamsters wurden durch topische Anwendung von 0,5-prozentiger Lösung von Dimethylbenzanthracen (DMBA) in Mineralöl innerhalb der rechten Backentasche dreimal wöchentlich induziert, bis makroskopische Tumoren gesehen wurden. Die Induktion sichtbarer Tumoren dauerte durchweg 6–10 Wochen. Traumatisierte Backentaschen mit nicht-bösartigen Läsionen wurden durch topische Anwendung von Natriumlaurylsulfat (SLS) täglich für vier Tage gebildet. Entzündetes Gewebe entwickelt sich innerhalb von vier Tagen. In einer Blindstudie beurteilte ein Pathologe die Histologie aller Lesionen.

[0075] Das Chelat aus Beispiel 10 (Eu-CM(ZTPE)) wurde in einer 5-prozentigen Ethanollösung in einer Konzentration von 0,5 mM gelöst. Zwischen 1,0 und 1,5 ml der Chelatlösung wurden durch topische Anwendung eingebracht, und man ließ sie sich für eine Dauer von 10 Minuten in der Backentasche sammeln. Nach der 10-minütigen Inkubationsdauer wurde das Gewebe mit einer 5-prozentigen Ethanollösung gewaschen, gefolgt von Waschen mit Wasser, und es wurde dann schließlich mit einem Wattestäbchen saubergewischt, um sicherzustellen, dass die detektierte Fluoreszenz aus dem Gewebe kam und nicht von der Oberfläche.

[0076] Die Anregung des Chelats wurde durch Beleuchten mit 310 nm erzielt, während die Emission aufgezeichnet wurde, indem ein 600 nm (FWHM = 80 nm) Filter vor die CCD gebracht wurde. Farbphotographien wurden unter Verwendung eines Films mit Lichtempfindlichkeit 800 und einer 35mm-Kamera mit einer Belichtungszeit von annähernd 0,5 Sek ohne Hilfe eines Emissionsfilters erhalten. Fig. 3 veranschaulicht die Ergebnisse der topischen Anwendung des Chelatbildners auf die Hamsterbackentasche.

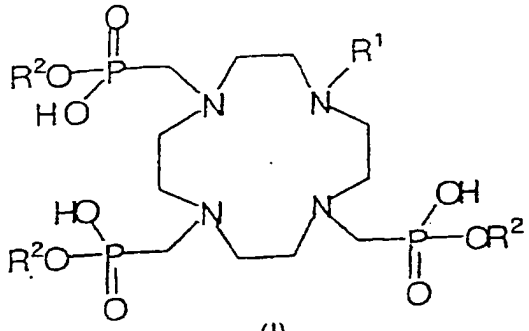
[0077] Diese Ergebnisse zeigen, dass diese Chelatbildner verwendet werden können, um Abnormalitäten zu detektieren, wie sie in Tieren gesehen werden.

[0078] Es ist beabsichtigt, dass die Beschreibung und die Beispiele nur als beispielhaft betrachtet werden, wobei der tatsächliche Umfang und der Geist der Erfindung durch die folgenden Ansprüche bezeichnet wer-

den.

Patentansprüche

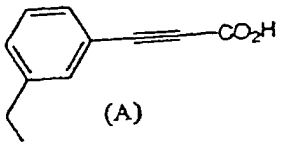
1. Tetraazamakrozyklische Verbindungen der Formel



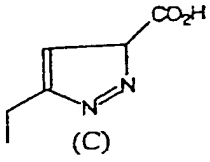
(I)

wobei R^1

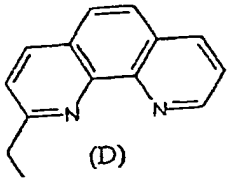
1



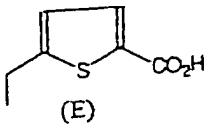
(A)



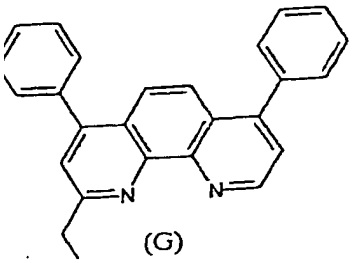
(C)



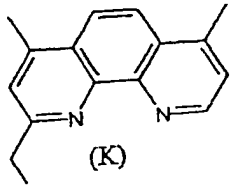
(D)



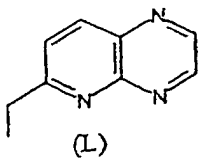
(E)



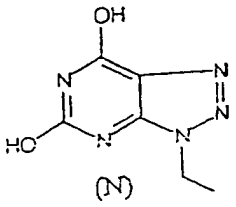
(G)



(K)

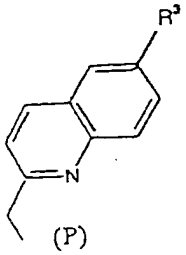


(L)



(N)

oder



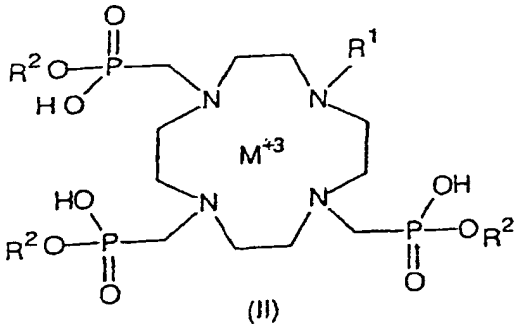
(P)

ist

R^2 Methyl, Ethyl, Propyl, Butyl oder H ist, und

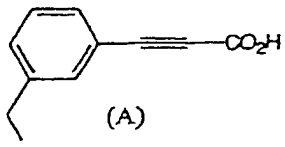
R^3 F, C1-C4-Alkyl, O(C_1-C_4-Alkyl) oder Cl ist, oder pharmazeutisch akzeptable Salze davon.

2. Tetraazamakrozyklische Chelatverbindungen der Formel

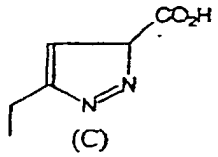


(II)

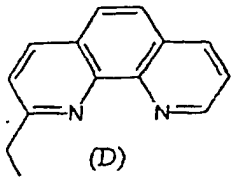
wobei R^1



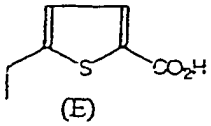
(A)



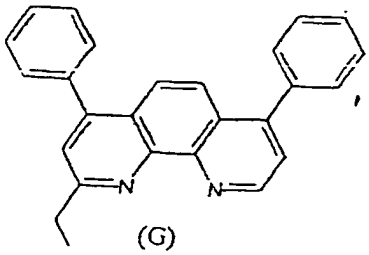
(C)



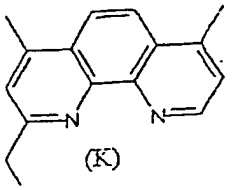
(D)



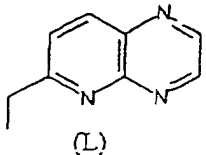
(E)



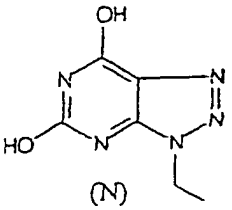
(G)



(K)

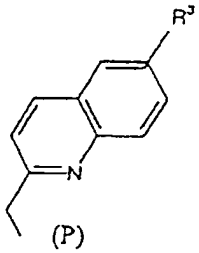


(L)



(N)

oder



(P)

ist,
R^2 Methyl, Ethyl, Propyl, Butyl oder H ist, und
R^3 F, C1-C4-Alkyl, $O(C_1-C_4$-Alkyl) oder C1 ist,
M ein Metallion von Terbium (Tb), Europium (Eu), einem Lanthanoid (La) oder Dysprosium (Dy) ist, oder pharmazeutisch akzeptable Salze davon.

3. Terbium-1-[2-(6-methoxy)methylenchinolinyl)]-4,7,10-tri(methylenphosphonsäure)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan.

4. Europium-1-[2-(6-methoxy)methylenchinolinyl)]-4,7,10-tri(methylenphosphonsäure)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan.

5. Europium-1-[2-(6-chlor)methylenchinolinyl)]-4,7,10-tri(methylenphosphonsäure)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan.

6. Terbium-1-[2-(6-chlor)methylenchinolinyl)]-4,7,10-tri(methylenphosphonsäure)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan.

7. Europium-1-[2-(6-fluor)methylenchinolinyl)]-4,7,10-tri(methylenphosphonsäure)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan.

8. Terbium-1-[2-(6-fluor)methylenchinolinyl)]-4,7,10-tri(methylenphosphonsäure)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan.

9. Pharmazeutische Formulierung umfassend eine Verbindung gemäß Anspruch 1 mit einem pharmazeutisch akzeptablen Träger.

10. Formulierung gemäß Anspruch 9, wobei die Menge des Chelats in einer Lösung zur Verabreichung von 0,1 mM bis 5 mM beträgt.

11. Verwendung einer Verbindung gemäß Anspruch 1 zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Diagnose eines Krankheitszustandes in einem Tier.

12. Verwendung gemäß Anspruch 11 zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung, wobei das formulierte Chelat als eine injizierbare Lösung oder als eine Waschlösung bereitgestellt wird.

13. Verwendung gemäß Anspruch 11 zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung, wobei die Dosis des Chelats zur topischen Verabreichung bereitgestellt wird und in Lösungsform von 0,1 mM bis 5 mM vorliegt.

14. Verwendung einer Verbindung gemäß Anspruch 1 zur Herstellung einer Zusammensetzung zur Abbildung eines Tieres.

15. Verwendung gemäß Anspruch 12 zur Herstellung einer Zusammensetzung, wobei das Bild unter Verwendung eines endoskopischen Fluoreszenzmikroskops erhalten wird.

16. Verwendung gemäß Anspruch 14 oder 15 zur Herstellung einer Zusammensetzung, wobei das Bild unter Verwendung einer UV-Lichtquelle erhalten wird.

17. Verwendung gemäß Anspruch 13 oder 14 zur Herstellung einer Zusammensetzung, wobei die quantitative Menge des Komplexes gemäß Anspruch 1 in der Formulierung im Gewebe bestimmt wird, welches in vivo abgebildet wird.

18. Verwendung gemäß Anspruch 11 zur Herstellung einer Zusammensetzung, wobei der Krankheitszustand Mundkrebs oder Ösophaguskrebs ist.

19. Verfahren für den in vitro-Immuntest oder eine DNS-Hybridisierung einer Gewebeprobe, umfassend Bringen der Probe auf ein Medium, Hinzufügen einer wirksamen Menge der Verbindung gemäß Anspruch 1 und gefolgt von Ablesen der Ergebnisse.

20. Verfahren zur Herstellung eines Komplexes gemäß Formel (II) wie in Anspruch 2 beansprucht, umfassend Reagierenlassen der Verbindung mit dem Metallionenhalogenid in wässriger Lösung.

21. Verwendung gemäß Anspruch 11 zur Herstellung einer Zusammensetzung, wobei die UV-Wellenlänge, die zur Detektion des Chelats gemäß Anspruch 2 für den Krankheitszustand verwendet wird, von 300–340 nm beträgt.

Es folgen 2 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

FIG. 1

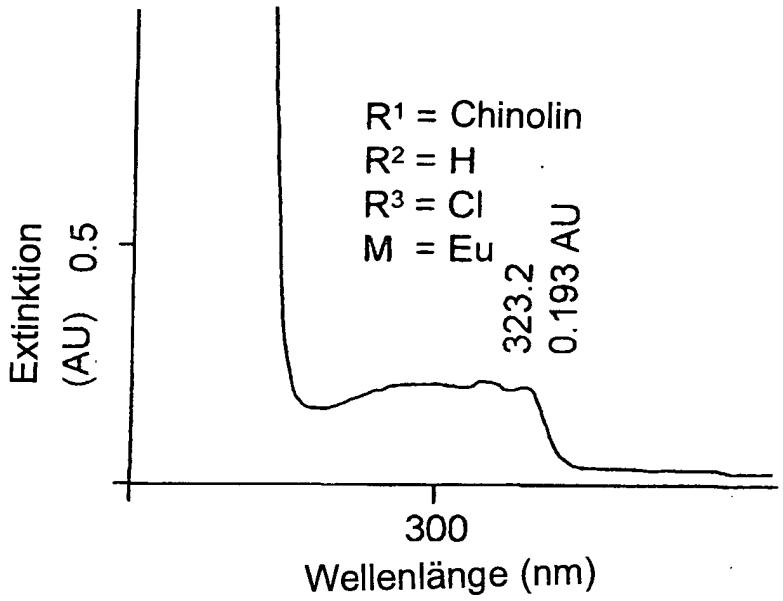


FIG. 2

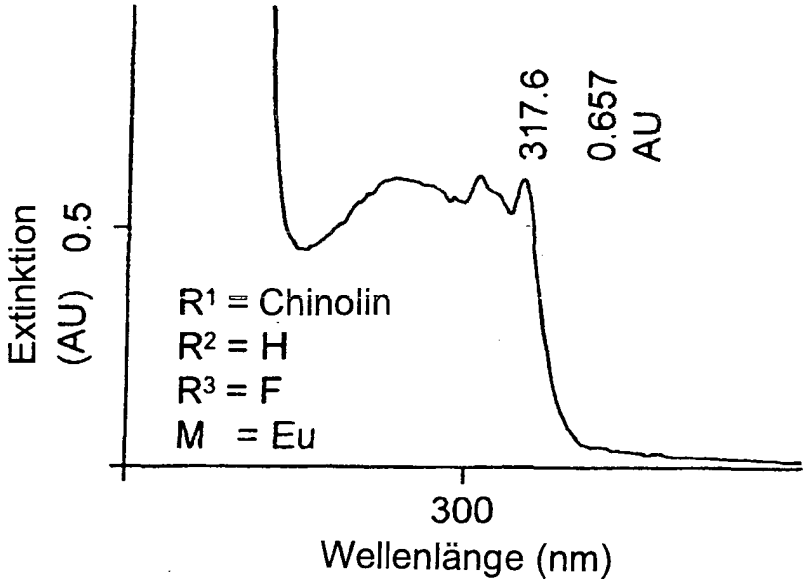


FIG. 3

