(19)

SUOMI - FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 955336 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS**
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE PUBLIC

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 955336

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification
C07F 9/6561
C07D471/18
C07D471/22
A61K 49/00

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **06.05.1994**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **06.11.1995**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **22.12.1995**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(86) Kansainvälinen hakemus - Internationell ansökan - International application **06.05.1994 PCT/US1994/005071**

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

06.05.1993 US 058622

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Dow Global Technologies Inc., Washington Street, 1790 Building, Midland, MI 48674, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Kiefer, Garry E., USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention
Varjoaineina käytettäviä trisyklopolyatsamakrosyklofosfonihappoja, nii den komplekseja ja johdannaisia
Tricyklopolyazamakrocyklofosfonsyror, komplex och derivat därav för an vändning som kontrasmedel

Varjoaineina käytettäviä trisyklopolyatsamakrosyklofosfonihappoja, niiden komplekseja ja johdannaisia

Tämä keksintö koskee ligandeja, jotka ovat trisyklopolyatsamakrosyklofosfonihappoja, niiden komplekseja ja niiden johdoksia, jotka soveltuvat käytettäviksi varjoaineina magneettikuvauksessa (MRI). Paremman käsityksen saamiseksi tästä keksinnöstä seuraavassa osassa on kuvattu lyhyesti MRI:n taustaa.

MRI on ei-invasiivinen diagnosointitekniikka, joka tuottaa resoluutioltaan hyviä poikkileikkauskuvia eläinruumiin, edullisesti ihmisruumiin, pehmeästä kudoksesta. Tämä tekniikka perustuu määrättyjen atomiytimien (esim. veden protonien), joilla on magneettinen momentti (joka määritellään matemaattisilla yhtälöillä; ks. G. M. Barrow, Physical Chemistry, 3. painos, McGraw-Hill, NY 1973), ominaisuuteen asettua yhdensuuntaisiksi magneettikentässä. Niiden järjestyttyä yhdensuuntaisiksi tätä tasapainotilaa voidaan häiritä ulkopuolisella radiotaajuuksisella (RF) impulssilla, joka saa protonit kiepsahtamaan pois magneettikentän suunnasta. RF-impulssin päättyessä ytimet palaavat tasapainotilaan, ja tämän paluun vaatima aika tunnetaan relaksaatioaikana. Relaksaatioaika koostuu kahdesta parametristä, jotka tunnetaan spin-hilarelaksaationa (t1) ja spin-spinrelaksaationa (t2), ja juuri nämä relaksaatiomittaukset antavat tietoa molekyylien järjestymisasteesta ja protonien vuorovaikutuksista ympäristönsä kanssa.

Koska elävän kudoksen vesipitoisuus on merkittävä ja pitoisuudessa ja ympäristössä esiintyy vaihteluja kudostyyppien kesken, biologisista organismeista saadaan diagnostisia kuvia, jotka heijastavat protonitiheyttä ja relaksaatioaikoja. Mitä suurempia erot tutkittavassa kudoksessa esiintyvien protonien relaksaatioajoissa (t1 ja t2) ovat, sitä suurempi on kontrasti saatavassa kuvassa [esim. J. Magnetic Resonance 33 (1979) 83 - 106].

On tunnettua, että paramagneettiset kelaatit, joilla on symmetrinen elektronien perustila, voivat vaikuttaa dramaattisesti vierekkäisten vesiprotonien relaksaatioaikoihin t1 ja t2 ja että kelaatin tehokkuus tässä suhteessa on osaksi yhteydessä magneettisen momentin aikaansaavien parittomien elektronien lukumäärään (esim. Magnetic Resonance Annual, Raven Press, NY 1985, s. 231 - 266). On myös osoitettu, että annettaessa tämäntyyppistä paramagneettista kelaattia elävälle eläimelle, sen vaikutus eri kudosten t1:een ja t2:een voidaan havaita suoraan magneettikuvista (MR-kuvista) kontrastin lisääntyessä niillä alueilla, joille kelaatti paikantuu. Sen vuoksi on ehdotettu stabiilien, myrkyttömien, paramagneettisten kelaattien antamista eläimille MRI:n avulla saatavan diagnostisen tiedon lisäämiseksi [esim. Frontiers of Biol. Energetics I (1978) 752 - 759; J. Nucl. Med. 25 (1984) 506 - 513; Proc. of NMR Imaging Symp. (26. - 27. lokakuuta 1980); F. A. Cotton *et al.*, Adv. Inorg. Chem. 1966, 634 - 639]. Tällä tavalla käytettäviä paramagneettisia metallikelaatteja kutsutaan kontrastia lisääviksi aineiksi tai varjoaineiksi.

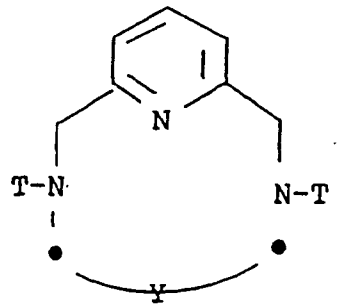
On olemassa monia paramagneettisia metalli-ioneja, joita voidaan harkita ryhdyttäessä suunnittelemaan MRI-varjoainetta. Käytännössä käyttökelpoisimpia paramagneettisia metalli-ioneja ovat kuitenkin gadolinium- (Gd^{3+}), rauta- (Fe^{3+}), mangaani- (Mn^{2+} ja Mn^{3+}) ja kromi-ioni (Cr^{3+}), koska näillä ioneilla on suurten magneettisten momenttiensa ansiosta suurin vaikutus vesiprotoneihin. Kompleksoitumattomassa muodossa (esim. $GdCl_3$) nämä metalli-ionit ovat eläimelle myrkyllisiä, mikä sulkee pois niiden käyttämisen yksinkertaisen suolan muodossa. Orgaanisen kelaatinmuodostajan (jota kutsutaan myös ligandiksi) perustehtävänä on siis tehdä paramagneettisesta metalli-ionista eläimelle myrkytön ja säilyttää samalla sen toivottu vaikutus ympäröivien vesiprotonien relaksaatioaikoihin t1 ja t2.

MRI-alan kirjallisuutta on melko paljon, joten seuraava yhteenveto, jonka ei ole tarkoituskaan olla täydellinen, on esitetty ainoastaan katsauksena tälle alueelle ja muihin yhdisteisiin, jotka mahdollisesti ovat rakenteeltaan samankaltaisia. US-patenttijulkaisussa 4 899 755 on esitetty menetelmä protonien NMR-relaksaatioaikojen vaihtelemiseksi eläimen maksassa ja sappitiehyessä käyttämälläFe^{3+}-etyleenibis(2-hydroksifenyyli)glysiinikomplekseja ja sen johdoksia sekä ehdotettu erilaisten muiden yhdisteiden ohella yhtenä mahdollisuutena pyridiinimakrosyklometyleenikarboksyylihapon käyttöä. US-patenttijulkaisussa 4 880 008 [osaksi jatkoa (CIP) US-patenttijulkaisuun 4 899 755] on esitetty lisätietoja, jotka liittyvät rotan maksakudoksen kuvaukseen, mutta mitään lisäkomplekseja ei ole esitetty. US-patenttijulkaisussa 4 980 148 on esitetty MRI:hin soveltuvia gadoliniumkomplekseja, jotka eivät ole syklisiä yhdisteitä. C. J. Broan *et al.* (J. Chem. Soc., Chem. Commun. 1990, 1739 - 1741) ovat kuvanneet eräitä bifunktionaalisia makrosyklisiä fosfiinihappoyhdisteitä. C. J. Broan *et al.* (J. Chem. Soc., Chem. Commun. 1990, 1738 - 1739) ovat kuvanneet yhdisteitä, jotka ovat triatsabisykloyhdisteitä. I. K. Adzamli *et al.* [J. Med. Chem. 32 (1989) 139 - 144] ovat kuvanneet gadoliniumkompleksien asyklisiä fosfonaattijohdoksia, jotka soveltuvat magneettikuvaukseen.

Nykyisin ainoat kaupalliset varjoaineet, joita on saatavissa Yhdysvalloissa, ovat gadoliniumin dietyleenitriamiinipentaetikkahapon kanssa muodostama kompleksi (DTPA-Gd^{3+} – Magnevist™, jota valmistaa Schering) ja DO3A-johdos [1,4,7-tris(karboksimetyyli)-10-(2-hydroksipropyyli)-1,4,7,10-tetra-atsasyklododekanaatto]gadolinium (Prohance™, jota valmistaa Squibb). Magnevistia™ ja Prohancea™ pidetään epäspesifisinä aineina/perfuusioaineina, koska ne jakaantuvat vapaasti ekstrasellulaariseen nesteeseen ja poistuvat sen jälkeen tehokkaasti munuaisten kaut-

ta. Magnevist™ on osoittautunut erittäin arvokkaaksi aivovaurioiden diagnosoinnissa, koska siihen liittyvä veriaivoesteen murtuminen mahdollistaa varjoaineen perfuusion vaurioituneille alueille. Magnevistin™ lisäksi Guerbet markkinoi makrosyklistä perfuusioainetta [1,4,7,10-tetrakis(karboksimetyyli)-1,4,7,10-tetra-atsasyklododekanaatto]gadolinium (Dotarem™), jota on nykyisin saatavissa ainoastaan Euroopassa. Prohancella™ on osoitettu olevan vähemmän sivuvaikutuksia kuin Magnevistilla™. Joukko muita potentiaalisia varjoaineita on eri kehitysvaiheissa.

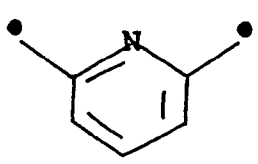
Tämä keksintö koskee uudenlaisia ligandeja, jotka ovat makrosyklisiä tri- ja tetrasyklopolyatsayhdisteitä ja niiden johdoksia, joilla on kaava



(I)

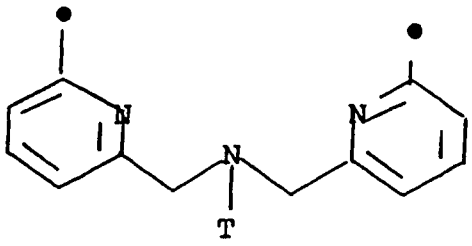
jossa

Y on joko ryhmä



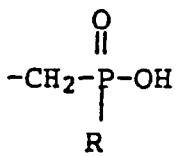
(A)

tai



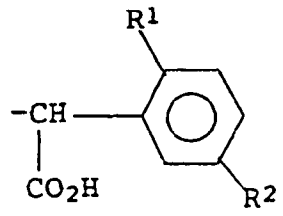
(B)

T on ryhmä $-CH_2-COOH$ tai



;

jossa R on OH-ryhmä, C_{1-5}-alkyyliryhmä tai ryhmä -O-(C_{1-5}-alkyyli),
sillä edellytyksellä, että molemmat T-osat ovat samoja, tai toinen T on ryhmä



jossa
R^1 on OH- tai OCH_3-ryhmä ja
R^2 on NO_2-, NH_2-, isotiosyanaatto-, semikarbatsido-, tiosemikarbatsido-, maleimido-, bromiasetamido- tai karboksyyliryhmä;
tai niiden farmaseuttisesti hyväksyttäviä suoloja.

Kun edellä kuvatuissa kaavan I mukaisissa ligandeissa
kaikki T:t ovat ryhmiä -CH_2-P(O)ROH, jossa R on OH-ryhmä, tai niiden farmaseuttisesti hyväksyttäviä suoloja, ligandeista käytetään tässä merkintää BP2P ryhmän A tapauksessa ja merkintää TP3P ryhmän B tapauksessa;
kaikki T:t ovat ryhmiä -CH_2-COOH tai niiden farmaseuttisesti hyväksyttäviä suoloja, ligandeista käytetään tässä merkintää BP2A ryhmän A tapauksessa ja merkintää TP3A ryhmän B tapauksessa;
kaikki T:t ovat ryhmiä -CH_2-P(O)ROH, jossa R on ryhmä -O-(C_{1-5}-alkyyli), tai niiden farmaseuttisesti hyväksyttäviä suoloja, ligandeista käytetään tässä merkintää BP2(O-Alk)P ryhmän A tapauksessa ja merkintää TP3(O-Alk)P ryhmän B tapauksessa; ja
kaikki T:t ovat ryhmiä -CH_2-P(O)ROH, jossa R on C_{1-5}-alkyyliryhmä, tai niiden farmaseuttisesti hyväksyttäviä suoloja, ligandeista käytetään tässä merkintää BP2(Alk)P ryhmän A tapauksessa ja merkintää TP3(Alk)P ryhmän B tapauksessa.

Tämän keksinnön mukaiset kompleksit voidaan suunnitella sellaisiksi, että saavutetaan määrätty kokonaisvaraus, joka vaikuttaa edullisesti biopaikantumiseen *in vivo* ja kuvan kontrastiin. Esimerkiksi metalli-ionin varauksen ollessa +3 voidaan saavuttaa seuraavat kokonaisvaraukset:

kokonaisvaraus -3, kun kaava I on TP3P, jollaiset ovat käyttökelpoisia varjoaineina kalkkipitoista kudosta kuvattaessa;

kokonaisvaraus -1, kun kaava I on BP2P, jollaiset ovat käyttökelpoisia varjoaineina kalkkipitoista kudosta kuvattaessa;

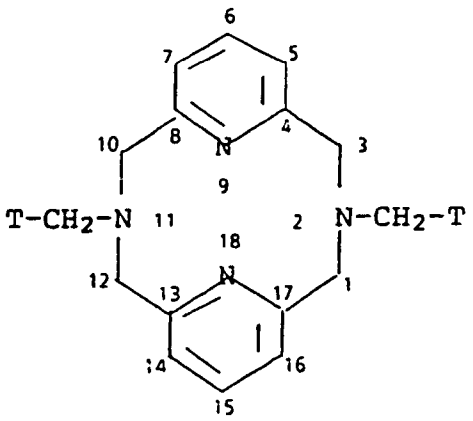
kokonaisvaraus 0, kun kaava I on TP3A, TP3(O-Alk)P tai TP3(Alk)P, jollaiset ovat käyttökelpoisia yleisinä perfuusiovarjoaineina; ja

kokonaisvaraus +1, kun kaava I on BP2A, BP2(O-Alk)P tai BP2(Alk)P, jollaiset ovat käyttökelpoisia varjoaineina kalkkipitoista kudosta kuvattaessa.

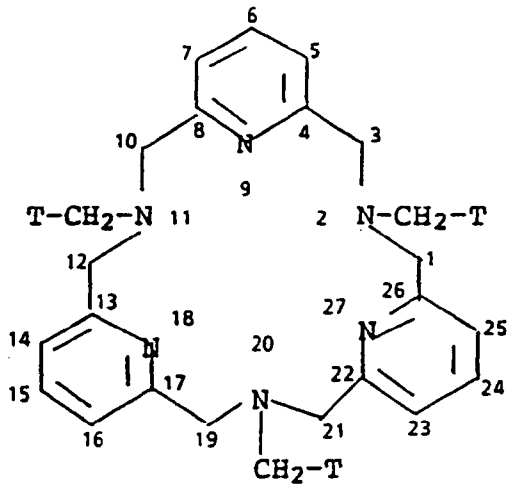
Kompleksit voidaan formuloida sellaisiksi, että ne ovat eläimelle annettavaksi soveltuvassa, farmaseuttisesti hyväksyttävässä muodossa.

Yhden T-osan ollessa muu kuin ryhmä $-CH_2-COOH$ tai $-CH_2-PO_2HR$ yhdiste on bifunktionaalinen ligandi/kompleksi ja voidaan kytkeä ryhmän R^2 välityksellä biologisesti aktiiviseen molekyyliin.

Kaavan I mukaiset yhdisteet numeroidaan nimeämistarkoituksia varten seuraavasti:



(IA)



(IB)

Yksi puoli tätä keksintöä koskee sellaisten varjoaineiden kehittämistä, joissa paramagneettista kelaattia on muunnettu synteettisesti varjoaineen toimittamisen paikkaspesifisesti haluttuun kudokseen mahdollistamiseksi. Etuna on lisääntynyt kontrasti kiinnostuksen kohteena olevilla alueilla, joka kontrasti perustuu kudosaffiniteettiin toisin kuin kontrasti, jonka saa aikaan epäspesifinen perfuusio ja joka saattaa tulla tai olla tulematta esiin ekstrasellulaarisen aineen yhteydessä. Kaavan I mukaisen ligandin spesifisyyttä voidaan kontrolloida säätelemällä kompleksin kokonaisvarausta ja lipofiilista luonnetta. Kompleksin kokonaisvarauksen vaihtelualue on -3 - +1, kuten edellä mainittiin. Esimerkiksi sellaisen kompleksin tapauksessa, joka sisältää 2 tai 3 PO_3H_2-ryhmää (BP2P ja TP3P), kokonaisvaraus on selvästi negatiivinen ja vastaanotto luuhun on odotettavissa, kun taas kompleksin kokonaisvarauksen ollessa 0 [siis neutraali; TP3A, TP3(O-Alk)P ja TP3(Alk)P] kompleksi saattaa kyetä läpäisemään veriaivoesteen ja normaali vastaanotto aivoihin saattaa olla mahdollista. Kompleksin tapauksessa, jonka kokonaisvaraus on +1 [BP2A, BP2(O-Alk)P ja BP2(Alk)P], ilmenee odottamatta kompleksin vastaanottoa luuhun.

Arvellaan, haluamatta kuitenkaan sitoutua teoriaan, että valmistettaessa keksinnön mukainen varautunut kompleksi (varaus kenties esimerkiksi -3 luun, -1 maksan tai +1 sydämen kuvantamisen tapauksessa) vaihtelut kyseisessä kelaatin ionivarauksessa voivat vaikuttaa biopaikantumiseen.

Kudospsesifisyys voidaan saavuttaa sitomalla kelaatti ionisesti tai kovalenttisesti luonnossa esiintyvään tai synteettiseen molekyyliin (esim. ryhmän R^2 välityksellä), joka on halutun kohdekudoksen suhteen spesifinen. Tämän menettelytavan yksi mahdollinen sovellus on käyttää kelaattia, joka on kytketty monoklonaalisiin vasta-aineisiin, jotka kuljettaisivat paramagneettisen kelaatin sai-

raaseen kudokseen ja tekisivät visualisoinnin MRI:llä mahdolliseksi. Lisäksi paramagneettisen kelaatin sitominen makromolekyyliin voi lisätä varjoaineen tehoa edelleen, mistä on seurauksena parantunut kontrasti sitomattomaan kelaattiin verrattuna. Laufferin hiljattainen tutkimustyö (US-patenttijulkaisut 4 880 008 ja 4 899 755) on osoittanut, että lipofiilisuuden muutokset voivat johtaa kudosspesifisiin aineisiin ja että lisääntynyt lipofiilinen luonne edistää ei-kovalenttisia vuorovaikutuksia veriproteiinien kanssa, mistä on seurauksena relaksiviteetin paraneminen.

Kaavan I yhteydessä ja tämän keksinnön kuvaamiseen käytetyt ilmaisut määritellään tarkemmin seuraavasti:

"C_{1-5}-alkyyli" sulkee sisäänsä sekä suoraketjuiset että haarautuneet alkyyliryhmät.

"Eläin" tarkoittaa tasalämpöistä nisäkästä, edullisesti ihmistä.

"Kompleksi" tarkoittaa keksinnön mukaisen, esimerkiksi kaavan I mukaisen, yhdisteen metalli-ionin kanssa muodostamaa kompleksia, jossa on kelatoituneena tai kompleksoituneena ainakin yksi metalliatomi.

"Biologisesti aktiivinen aine" tarkoittaa dekstraania, peptidiä tai molekyylejä, joilla on spesifinen affiniteetti johonkin reseptoriin, tai edullisesti vasta-aineita tai vasta-ainefragmentteja.

"Vasta-aine" tarkoittaa mitä tahansa polyklonaalista, monoklonaalista tai kimeeristä vasta-ainetta tai heterovasta-ainetta, edullisesti monoklonaalista vasta-ainetta; "vasta-ainefragmentti" tarkoittaa Fab-fragmentteja ja $F(ab')_2$-fragmentteja sekä mitä tahansa sellaista osaa vasta-aineesta, joka on spesifinen halutun epitoopin tai haluttujen epitooppien suhteen. Käytettäessä ilmaisua "radioaktiivinen metallikelaatti/vasta-ainekonjugaatti" tai "konjugaatti" termillä "vasta-aine" tarkoitetaan kokonaisia vasta-aineita ja/tai vasta-ainefragmentteja, niiden

puolisynteettiset ja geeniteknisesti tuotetut muunnokset mukaan luettuina. Mahdollisia vasta-aineita ovat 1116-NS-19-9 (paksusuolen-peräsuolensyövän vastainen), 1116-NS-3d (CEA:n vastainen), 703D4 (ihmisen keuhkosyövän vastainen), 704A1 (ihmisen keuhkosyövän vastainen), CC49, CC83 ja B72.3. Hybridoomasolulinjat 1116-NS-19-9, 1116-NS-3d, 703D4, 704A1, CC49, CC83 ja B72.3 on talletettu American Type Culture Collectioniin, ja niiden tulonumerot ovat vastaavasti ATCC HB 8059, ATCC CRL 8019, ATCC HB 8301, ATCC HB 8302, ATCC HB 9459, ATCC HB 9453 ja ATCC HB 8108.

Tässä kuvattuja bifunktionaalisia kelaatinmuodostajia (joita kuvaa kaava I) voidaan käyttää metalli-ionien kelatointiin tai kompleksointiin metalli-ionikelaattien (joita kutsutaan tässä myös "komplekseiksi") muodostamiseksi. Kompleksit voidaan, koska niissä esiintyy funktionaalinen osa (jota vastaa R^2 kaavassa I), sitoa kovalenttisesti biologisesti aktiivisiin aineisiin, kuten dekstraaniin, molekyyleihin, joilla on spesifinen affiniteetti johonkin reseptoriin, tai edullisesti vasta-aineisiin tai vasta-ainefragmentteihin. Tässä kuvatut kompleksit voidaan siis sitoa kovalenttisesti vasta-aineeseen tai vasta-ainefragmenttiin tai spesifinen affiniteetti johonkin reseptoriin, ja niitä kutsutaan tässä "konjugaateiksi".

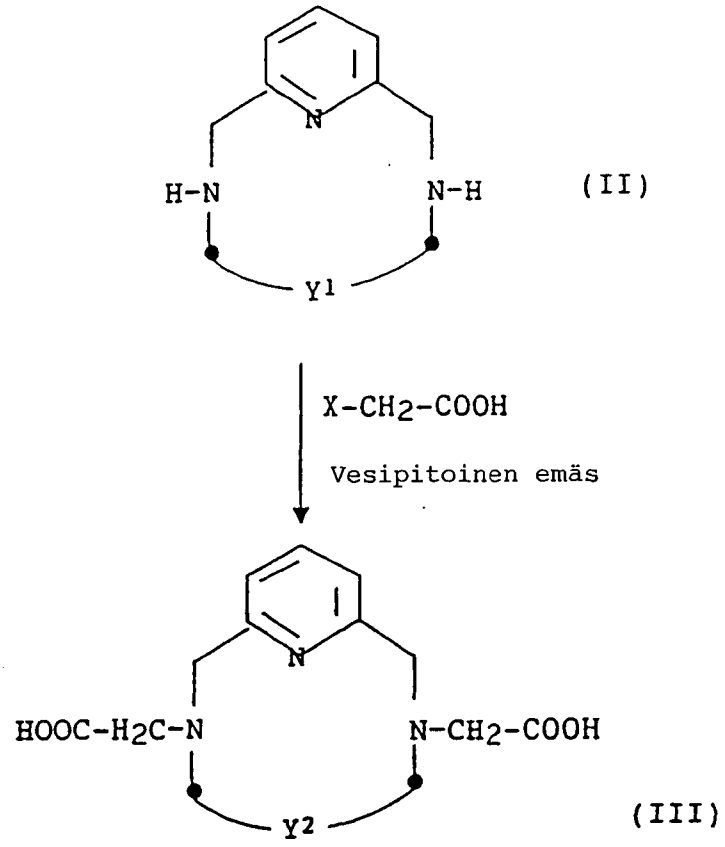
Ilmaisu "farmaseuttisesti hyväksyttävät suolat" tarkoittaa tässä käytettynä mitä tahansa kaavan I mukaisen yhdisteen suoloja tai suolojen seokseia, jotka ovat riittävän myrkyttömiä soveltuakseen eläinten, edullisesti nisäkkäiden, diagnosointiin. Tämän keksinnön mukaisesti voidaan siis käyttää suoloja. Tyypillisiä esimerkkejä suoloista, joita muodostetaan tavanomaisilla reaktioilla sekä orgaanisista että epäorgaanisista lähteistä, ovat esimerkiksi rikki-, suola-, fosfori-, etikka-, meripihka-, sitruuna-, maito-, maleiini-, fumaari-, palmitiini-, kooli-, pamoiini-, lima-, glutamiini-, glukoni-, D-kamferi-, glutaari-, glykoli-, ftaali-, viini-, muurahais-, lauriini-,

steariini-, salisyyli-, metaanisulfoni-, bentseenisulfoni-, sorbiini-, pikriini-, bentsoe- ja kanelihapposuolat ja muiden sopivien happojen suolat. Niihin kuuluvat myös suolat, joita saadaan tavanomaisilla reaktioilla sekä orgaanisista että epäorgaanisista lähteistä, kuten ammoniumionista, 1-deoksi-1-(metyyliamino)-D-glusitolista, alkalimetalli-ioneista, maa-alkalimetalli-ioneista ja muista samankaltaisista ioneista. Erityisen edullisia ovat kaavan I mukaisten yhdisteiden kalium-, natrium- ja ammoniumsuolat. Käyttökelpoisiin suoloihin kuuluvat myös edellä mainittujen suolojen seokset.

Kaavan I mukaisia yhdisteitä valmistetaan monin eri menetelmin. Tyypillisiä yleisiä syntetisointimenettelytapoja on esitetty seuraavissa reaktiokaavioissa.

Kaaviossa 1 valmistetaan yhdisteitä, joilla on kaava I, jossa Y on ryhmä A tai B ja kaikki T-osat ovat ryhmiä $-CH_2-COOH$.

Kaavio 1



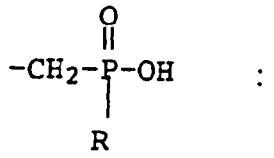
(II)

(III)

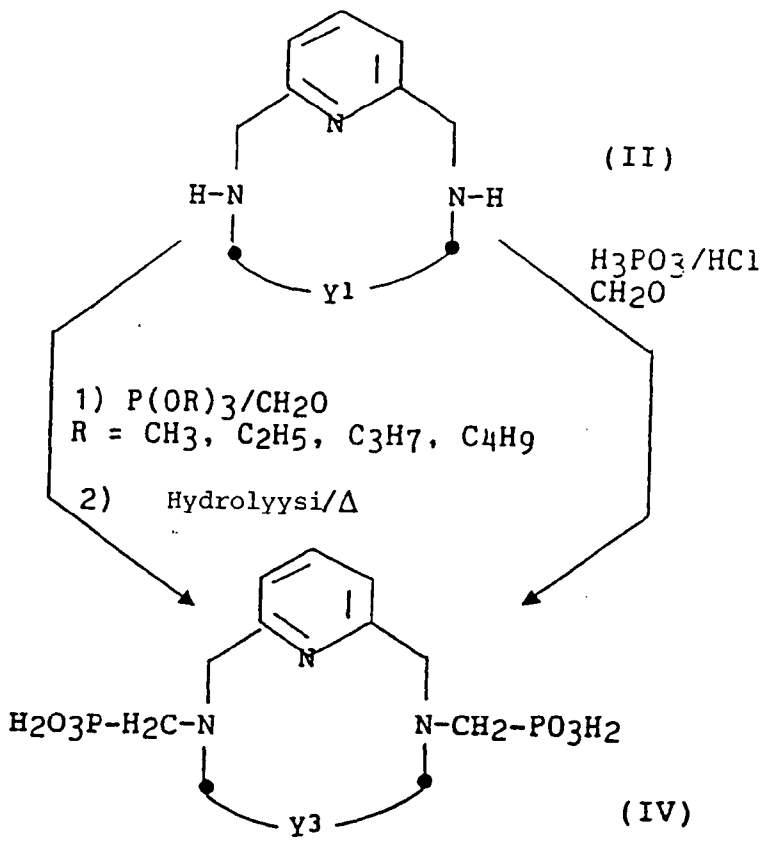
jossa Y^1 on Y:lle edellä esitetyn määritelmän mukainen ollessaan ryhmä A ja, kun se on ryhmä B, typpiatomi on substituoitu vedyllä; X on kloori tai bromiatomi; ja Y^2 on Y:lle edellä esitetyn määritelmän mukainen ollessaan ryhmä A ja, kun se on ryhmä B, typpiatomi on substituoitu ryhmällä $-CH_2-COOH$.

Vesipitoinen emäs on alkalimetallihydroksidi, kuten natriumhydroksidi tai kaliumhydroksidi. Reaktion pH pidetään suunnilleen alueella 8 - 12. Lämpötila on noin 60 - 90 °C eikä paine ole ratkaiseva, joten käytetään ympäristön painetta.

Kaaviossa 2 valmistetaan yhdisteitä, joilla on kaava I, jossa Y on ryhmä A tai B ja kaikki T-osat ovat ryhmiä

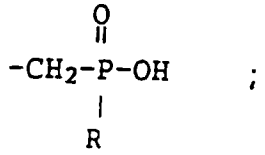


jossa R on OH-ryhmä.



Kaaviossa 2 mainittu hydrolyysi toteutetaan tunnetuissa vesipitoisissa happamissa olosuhteissa, kuten käyttämällä 3 - 12 M suolahappoa. Reaktion pH pidetään arvon 3 alapuolella. Lämpötila on palautusjäähdytyslämpötila. Paine ole ratkaiseva, joten käytetään ympäristön painetta. Vaihtoehtoisesti reaktio toteutetaan yhdessä vaiheessa käyttämällä fosforihapoketta, suolahappoa ja ylimäärin formaldehydiä. Reaktion pH on alle 2. Lämpötila on palautusjäähdytyslämpötila. Paine ole ratkaiseva, joten käytetään ympäristön painetta.

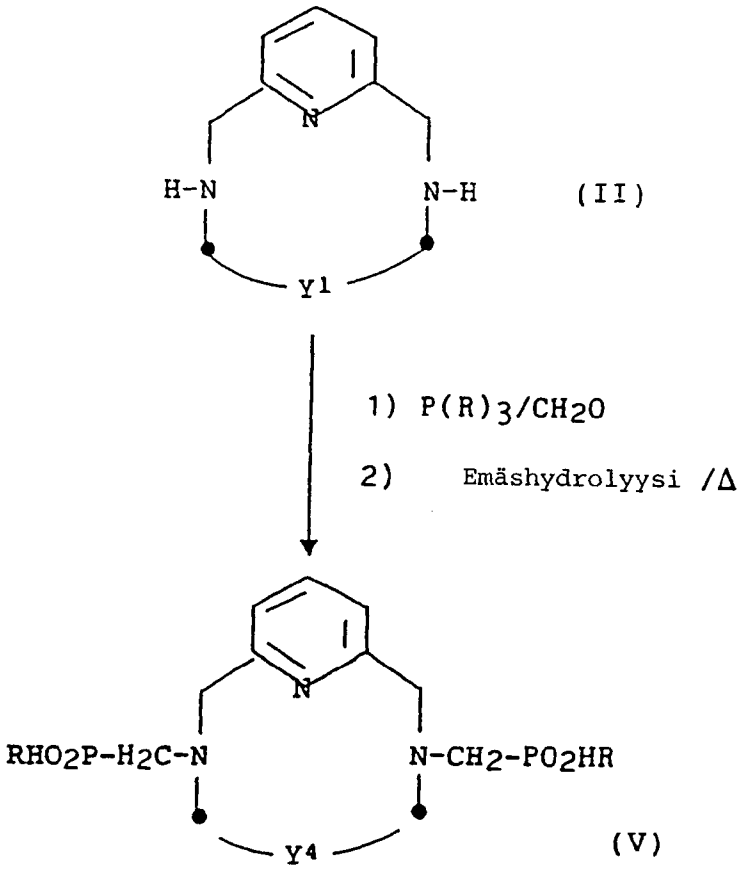
Kaaviossa 3 valmistetaan yhdisteitä, joilla on kaava I, jossa Y on ryhmä A tai B ja kaikki T-osat ovat ryhmiä



;

jossa R on ryhmä -O-(C_{1-5}-alkyyli).

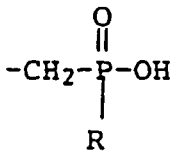
Kaavio 3



jossa Y^1 on Y:lle edellä esitetyn määritelmän mukainen ollessaan ryhmä A ja, kun se on ryhmä B, typpiatomi on substituoitu vedyllä; Y^4 on Y:lle edellä esitetyn määritelmän mukainen ollessaan ryhmä A ja, kun se on ryhmä B, typpiatomi on substituoitu ryhmällä $-CH_2-PO_2HR$; ja R on ryhmä $-O-(C_{1-5}$-alkyyli).

Kaaviossa 3 mainittu hydrolyysi toteutetaan tunnetuissa vesipitoisissa emäksisissä olosuhteissa, kuten käyttämällä ylimäärin alkalimetallihydroksidia, kuten natrium- tai kaliumhydroksidia. Reaktion pH on yli 9. Lämpötila on palautusjäähdytyslämpötila. Paine ole ratkaiseva, joten käytetään ympäristön painetta.

Kaaviossa 4 valmistetaan yhdisteitä, joilla on kaava I, jossa Y on ryhmä A tai B ja kaikki T-osat ovat ryhmiä

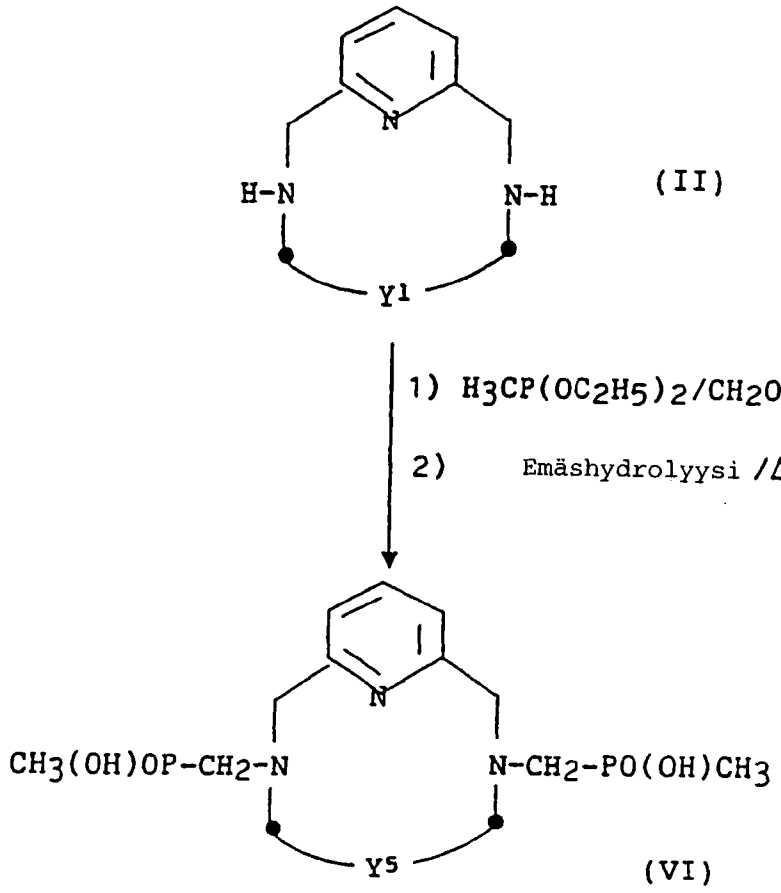


;

jossa R on C_{1-5}-alkyyliryhmä.

Kaavio 4 kuvaa kaavan I mukaisten yhdisteiden valmistusta R:n ollessa metyyliryhmä.

Kaavio 4



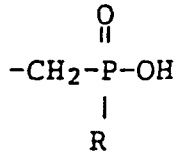
(II)

(VI)

jossa Y^1 on Y:lle edellä esitetyn määritelmän mukainen ollessaan ryhmä A ja, kun se on ryhmä B, typpiatomi on substituoitu vedyllä; Y^5 on Y:lle edellä esitetyn määritelmän mukainen ollessaan ryhmä A ja, kun se on ryhmä B, typpiatomi on substituoitu ryhmällä $-CH_2-PO(OH)CH_3$.

Kaaviossa 4 mainittu hydrolyysi toteutetaan tunnetuissa vesipitoisissa emäksisissä olosuhteissa, kuten käyttämällä ylimäärin alkalimetallihydroksidia, kuten natrium- tai kaliumhydroksidia. Reaktion pH on yli 9. Lämpötila on palautusjäähdytyslämpötila. Paine ole ratkaiseva, joten käytetään ympäristön painetta.

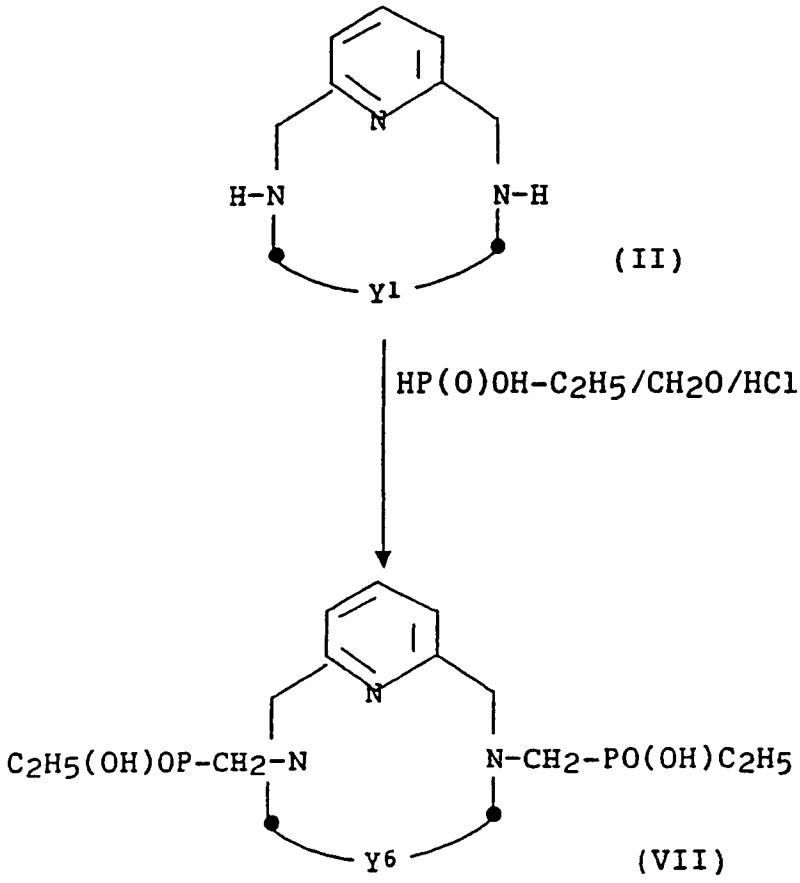
Kaaviossa 5 valmistetaan yhdisteitä, joilla on kaava I, jossa Y on ryhmä A tai B ja kaikki T-osat ovat ryhmiä



jossa R on C_{1-5}-alkyyliryhmä.

Kaavio 5 kuvaa kaavan I mukaisten yhdisteiden valmistusta R:n ollessa etyyliryhmä.

Kaavio 5



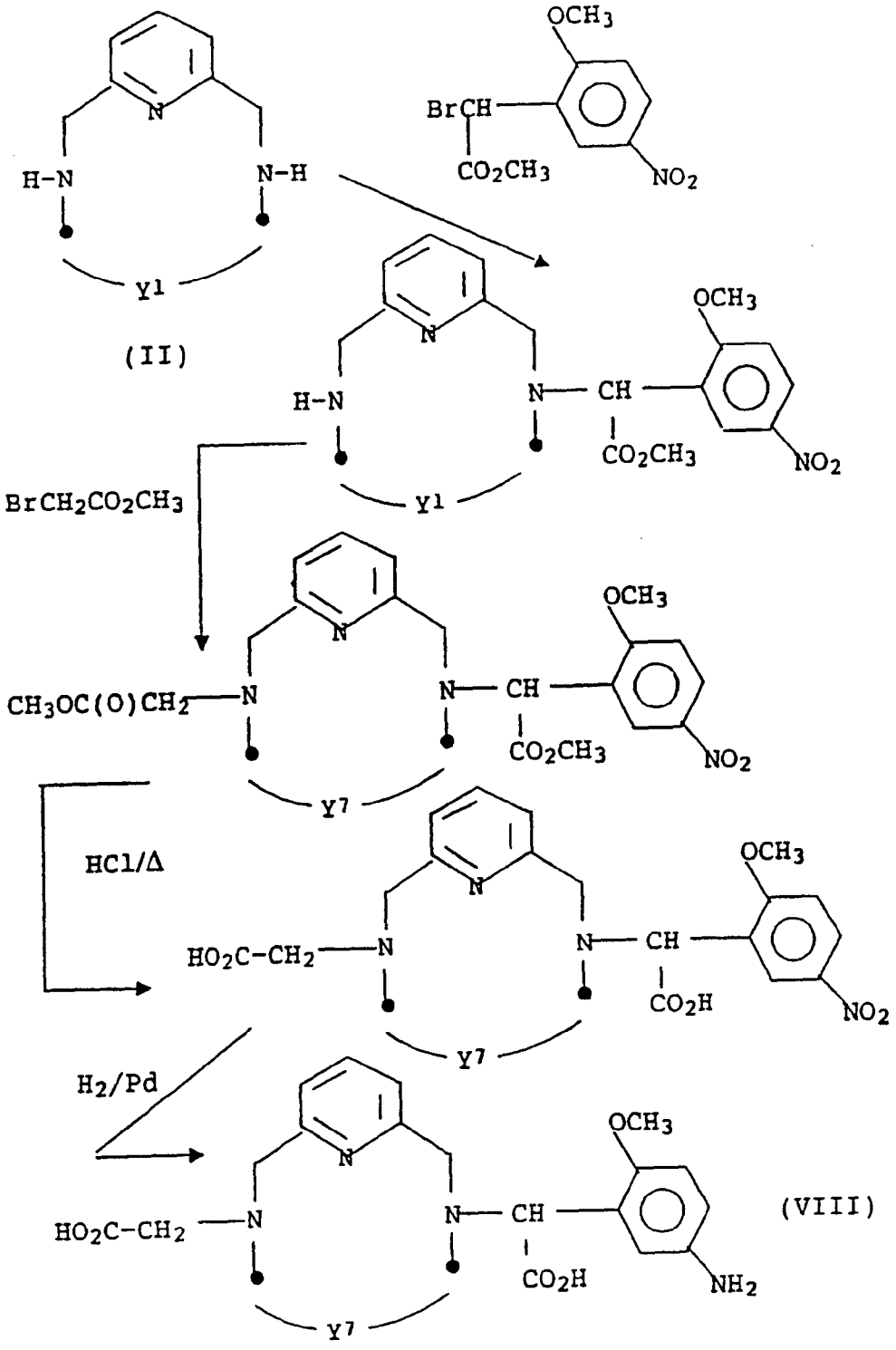
jossa Y^1 on Y:lle edellä esitetyn määritelmän mukainen ollessaan ryhmä A ja, kun se on ryhmä B, typpiatomi on substituoitu vedyllä; Y^6 on Y:lle edellä esitetyn määritelmän mukainen ollessaan ryhmä A ja, kun se on ryhmä B, typpiatomi on substituoitu ryhmällä $-CH_2-PO(OH)C_2H_5$.

Kaaviossa 5 kuvattu reaktio toteutetaan happamissa olosuhteissa suolahappoa käyttämällä. Reaktion pH on alle

3. Lämpötila on palautusjäähdytyslämpötila. Paine ole ratkaiseva, joten käytetään ympäristön painetta.

Kaavio 6 kuvaa kaavan I mukaisten yhdisteiden valmistusta silloin, kun toinen T on bifunktionaalinen ryhmä ja toinen on edellä kaavan I yhteydessä esitetyn määritelmän mukainen.

Kaavio 6



jossa Y^1 on Y:lle edellä esitetyn määritelmän mukainen ollessaan ryhmä A ja, kun se on ryhmä B, typpiatomi on substituoitu vedyllä; Y^7 on Y:lle edellä esitetyn määritelmän mukainen ollessaan ryhmä A ja, kun se on ryhmä B, typpiatomi on substituoitu ryhmällä $-CH_2-CO_2H$.

Mitä edellä esitettyihin kaavioihin tulee, prosessin yleinen kuvaus valaisee niitä nimenomaisia vaiheita, joita voidaan käyttää halutun reaktiovaiheen toteuttamiseksi. Näitä prosessivaiheita kuvataan yleisesti alla.

Yleistä syntetisointimenetelmää kaavioissa 1 - 6 pääpiirteittäin esitettyjen (2:2)- ja (3:3)-makrosyklisten esiasteiden valmistamiseksi on kuvattu artikkelissa Pappalerdo *et al.*, J. Org. Chem. 53 (1988) 3521 - 3529. Kaaviossa 1 kuvattuja karboksylaattijohdoksia valmistetaan tavanomaisin alkylointimenetelmin vesipitoisissa emäksisissä olosuhteissa käyttämällä hyväksi kloori- tai bromietikkahappoa ja käyttämällä lähtöaineena sopivaa makrosyklistä sekundaarista amiinia.

Kaavioissa 2 pääpiirteittäin esitettyjä fosfonihappojohdoksia voidaan valmistaa alkyloimalla amiini ensin trialkyylifosfiittia ja paraformaldehydiä käyttämällä, jolloin tuloksena on orgaaniseen liuotteeseen liukeneva peresteri. Tämä esteri hydrolysoidaan sitten palautusjäähdytyslämpötilassa happamissa olosuhteissa, jolloin saadaan haluttu aminofosfonihappo. Vaihtoehtoisesti fosfonihappo voidaan valmistaa happamissa olosuhteissa käyttämällä fosforihapoketta yhdessä formaldehydin ja suolahapon kanssa.

Fosfonaattipuoliestereitä valmistetaan, kuten kaaviossa 3 on esitetty, muodostamalla ensin dialkyylifosfonaattiesteri, mitä seuraa hydrolyysi emäksisissä olosuhteissa. Emäshydrolyysi saa aikaan täydellisen konversion puoliesteriksi.

Kaavio 4 valaisee menetelmää metyylifosfinaattijohdosten valmistamiseksi käyttämällä dietoksimetyylifosfiinia nukleofiilinä sekä paraformaldehydiä. Kondensaatio

voidaan toteuttaa liuotteissa, kuten tetrahydrofuraanissa (THF), dimetyyliformamidissa (DMF), dioksaanissa, asetonitriilissä tai alkoholia sisältävissä väliaineissa. Tuloksena oleva fosfinaattiesteri hydrolysoidaan sitten happamissa olosuhteissa (esim. 6 N HCl, 80 - 100 °C) tai emäksissä olosuhteissa (ylimäärin emästä, 40 - 100 °C), jolloin saadaan vastaava metyylifosfonihappo. Vaihtoehtoisesti voidaan, kuten kaaviossa 5 on esitetty, käyttää A. D. Sherryn *et al.* (Inorg. Chem., jätetty hyväksyttäväksi 1991) keksimää menetelmää, jossa käytetään *in situ* tuotettua etyylifosfonihappoa, fosfinaattijohdosten aikaansaamiseksi, joilla on voimakkaampi lipofiilinen luonne.

Kaavio 6 valaisee kaavan I mukaisten bifunktionaalisten yhdisteiden valmistusta, jotka voidaan sitten sitoa biologisesti aktiiviseen aineeseen.

Metalli-ionit, joita käytetään tämän keksinnön mukaisten kompleksien muodostamiseen, ovat Gd^{3+}, Mn^{2+} ja Fe^{3+} ja niitä myy esimerkiksi Aldrich Chemical Company. Läsnä oleva anioni on halogenidi, edullisesti kloridi, tai suolaa muodostamaton (metallioksidi).

"Paramagneettinen nuklidi" tarkoittaa tämän keksinnön yhteydessä metalli-ionia, jolla on spinimpulssimomentti ja/tai orbitaali-impulssimomentti. Kyseiset kaksi momenttityyppiä yhdessä saavat aikaan havaittavan paramagneettisen momentin tavalla, joka riippuu paljon parittoman elektronin sisältävistä atomeista ja pienemmässä määrin kyseisten atomien ympäristöstä. Paramagneettisia nuklideja, joiden on havaittu olevan käyttökelpoisia keksinnön käytännön sovelluksissa, ovat gadolinium (Gd^{3+}), rauta (Fe^{3+}) ja mangaani (Mn^{2+}), joista Gd^{3+} on edullinen.

Komplekseja valmistetaan alalla tunnetuin menetelmin. Tutustukaa näin ollen esimerkiksi teokseen Chelating Agents and Metal Chelates, Dwyer & Mellor, Academic Press 1964, lukuun 7. Tutustukaa myös teoksessa Synthetic Production and Utilization of Amino Acids (toimittajina Kame-

ko *et al.*), John Wiley & Sons 1974, esitettyihin menetelmiin aminohappojen valmistamiseksi. Yksi esimerkki kompleksin valmistamiseksi on antaa bisyklopolyatsamakrosyklofosfonihapon reagoida metalli-ionin kanssa pH:ssa 5 - 7 veden ollessa läsnä. Kompleksin muodostuminen tapahtuu kemiallisella sidoksella, ja tuloksena on stabiili paramagneettisen nuklidin sisältävä koostumus, esimerkiksi stabiili, mitä tulee paramagneettisen nuklidin dissosioitumiseen ligandista.

Tämän keksinnön mukaiset kompleksit annetaan sellaisina, että ligandin moolisuhde metalliin on vähintään noin 1:1, edullisesti 1:1 - 3:1, vielä edullisemmin 1:1 - 1,5:1. Suuri ylimäärä ligandia ei ole toivottava, koska kompleksoitumaton ligandi saattaa olla myrkyllinen eläimelle tai saattaa johtaa sydämen pysähdykseen tai veren vähäkalkkisuudesta aiheutuviin kouristuksiin.

Tätä keksintöä käytetään siihen soveltuvan fysiologisesti hyväksyttävän kantajan, täyteaineen tai väliaineen kera. Menetelmät sellaisten koostumusten valmistamiseksi ovat tunnettuja. Koostumukset voivat olla suspension, injektoitavaksi soveltuvan liuoksen tai muiden sopivien koostumusten muodossa. Voidaan käyttää fysiologisesti hyväksyttäviä suspendointiväliaineita, joissa mahdollisesti on mukana apuaineita.

Diagnosoinnissa käytetään "vaikuttava määrä" koostumusta. Annos vaihtelee sairauden ja eläimen fyysisten parametrien, kuten painon, mukaan. Myös *in vivo* diagnosoinnit ovat mahdollisia tämän keksinnön mukaisia koostumuksia käytettäessä.

Joidenkin tämän keksinnön mukaisten kelaatinmuodostajien muita käyttömahdollisuuksia voivat olla ei-toivottujen metallien (so. raudan) poisto kehosta, sitominen polymeerisiin kantajiin erilaisia tarkoituksia varten, esimerkiksi diagnostisiksi aineiksi, ja metalli-ionien poisto selektiivisellä uutolla. Kaavan I mukaisia ligande-

ja, joissa vähintään kahdessa R:ssä T = $-CH_2-P(O)R^1OH$, voidaan käyttää kattilakivenestoaineina metalli-ionien vähentämiseksi. Joitakin näistä ligandeista voidaan käyttää stoikiometristä määrää vähemmän. Samankaltaisia käyttömahdollisuksia tunnetaan yhdisteille, joita on kuvattu US-patenttijulkaisuissa 2 609 390, 3 331 773, 3 336 221 ja 3 434 969.

Keksintöä valaistaan tarkemmin seuraavien esimerkkien avulla, jotka on tarkoitettu pelkästään tätä keksintöä selventäviksi.

Eräät seuraavissa esimerkeissä käytetyt termit määritellään seuraavasti:

LC = nestekromatografia; puhdistukset tehtiin matalassa paineessa käyttämällä Dionex 2010i -systeemiä, joka on varustettu käsin täytettävällä Q-Sepharose™ -anioninvaihtopylväällä (23 x 2 cm).

DMF = dimetyyliformamidi

AcOH = etikkahappo

g = gramma(a)

mg = milligramma(a)

kg = kilogramma(a)

ml = millilitra(a)

µl = mikrolitra(a)

pH-stabiilisuus

Yleinen menettely

$^{159}GdCl_3$-varastoliuos (tai $^{153}SmCl_3$-varastoliuos) valmistettiin lisäämällä $GdCl_3$-kantajaliuokseen ($3 \cdot 10^{-4}$ mol/l, 2 ml) liuos (2 µl), joka sisälsi $^{159}GdCl_3$:a ($3 \cdot 10^{-4}$ mol/l) 0,1 N HCl:ssa. Sen jälkeen valmistettiin asianmukaiset ligandiliuokset deionisoituun veteen. Sitten valmistettiin ligandi-metallikompleksit (1:1) yhdistämällä ligandit (liuotettuina 100 - 500 µl:aan deionisoitua vettä) $^{159}GdCl_3$-varastoliuoksen (2 ml) kanssa ja sekoittamalla ne sen jälkeen perinpohjaisesti, jolloin saatiin hapan liuos (pH = 2). Liuoksen pH nostettiin sitten 1 N NaOH:a käyttämällä

arvoon 7. Sen jälkeen määritettiin kompleksina esiintyvän metallin prosenttiosuus laskemalla kompleksiliuosnäyte Sephadex™ G-50 -pylvään läpi, eluoimalla 4:1 suolaliuoksella (85 % $NaCl/NH_3OH$) ja keräämällä jakeet (2 x 3 ml). Radioaktiivisuuden määrää yhdistetyissä eluaateissa verrattiin sitten hartsiin jääneeseen määrään (kompleksoitumaton metalli pidättyy hartsiin). pH-stabiilisuusprofiili muodostettiin säätämällä kompleksiliuoserän pH:ta 1 M NaOH:lla tai 1 M HCl:lla, ja määrittämällä kompleksina esiintyvän metallin prosenttiosuus edellä kuvattua ioninvaihtomenetelmää käyttämällä. Sm:lla saatavien tulosten tiedetään kokeellisen vertailun perusteella olevan identtiset tämän keksinnön mukaisten ligandien kanssa kompleksoitumisen ja biologisen jakaantumisen suhteen.

Ligandien valmistus

Aineet ja menetelmät yleisesti

Kaikki reagenssit hankittiin kaupallisilta toimittajilta, ja niitä käytettiin sellaisina, kuin ne saatiin, ilman lisäpuhdistusta. NMR-spektrit rekisteröitiin Bruker AC-250 MHz -spektrometrillä, joka oli varustettu neliydinnäyteyksiköllä (^1H, ^{13}C, ^{31}P ja ^{19}F), lämpötilassa 297 K, ellei toisin ole ilmoitettu. ^1H-spektrit D_2O:ssa rekisteröitiin käyttämällä liuotteenvaimennuspulssijonoa ("PRESAT", homonukleaarinen esikyllästys). ^1H-spektreissä standardina on jäännöskloroformin ($CDCl_3$:ssa) aiheuttama piikki kohdassa δ 7,26 tai ulkopuolisen dioksaanin (D_2O:ssa) aiheuttama piikki kohdassa δ 3,55. Esitetyt ^{13}C- ja ^{31}P-spektreissä protonikytkentä on purettu (leveä huippu). Kemiallisten $^{13}C\{^1H\}$-siirtymien ilmoittamisessa käytettiin apuna DEPT-kokeita (DEPT = Distortionless Enhancement by Polarization Transfer). ^{13}C-spektreissä standardina on kloroformin keskimmäinen piikki kohdassa δ 77,00 ($CDCl_3$:ssa) tai ulkopuolisen dioksaanin aiheuttama piikki kohdassa δ 66,66 (D_2O:ssa). ^{31}P-spektreissä standardina on ulkopuolisen 85-%:isen H_3PO_4:n aiheuttama piikki kohdassa δ 0,00. Sula-

mispisteet määritettiin kapillaarisulatusmenetelmillä ja ovat korjaamattomia. Puolipreparatiiviset ioninvaihtokromatografiset erotukset tehtiin matalassa paineessa [< 4 100 kPa (600 psi)] käyttämällä tavanomaista lasikolonnia, joka oli varustettu käsin täytettävällä Q-Sepharose™ (anioninvaihto) tai SP-Sepharose™ (kationinvaihto) -lasipylväällä ja aallonpituudella 263 nm toimivalla UV-detektorilla (on-line) eluentin tarkkailemiseksi. GC/MS-spektrit ajettiin Hewlett Packard 5890A Gas Chromatograph/5970 Mass Selective Detector -yhdistelmällä.

Lähtöaineet

Esimerkki A

N,N'-ditosyyli-2,11-diatsa[3,3](2,6)pydinofaanin valmistus

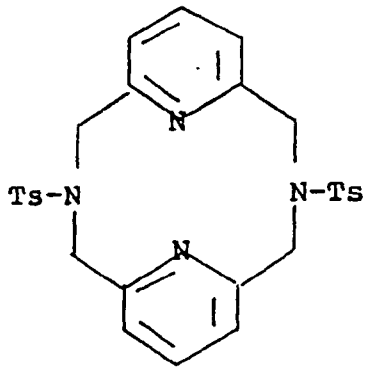
Liuokseen, joka sisälsi tosyyliamidin natriumsuolaa (TsNHNa) (13,52 g, 70 mmol) vedettömässä DMF:ssa (1,3 l) ja jota sekoitettiin lämpötilassa 80 °C, lisättiin N_2-kaasukehän alla pisaroittain (1,5 h) liuos, joka sisälsi 2,6-bis(kloorimetyyli)pyridiiniä (12,32 g, 70 mmol) DMF:ssa (200 ml). Tunnin kuluttua lisättiin yhdellä kertaa kiinteää TsNHNa:a (13,52 g, 70 mmol), ja seosta sekoitettiin lämpötilassa 80 °C vielä 16 h. Reaktioseos jäähdytettiin sitten huoneenlämpötilaan ja dekantoitiin. Liuote poistettiin alipaineessa ja jäännös yhdistettiin asetonin kanssa ja suodatettiin, jolloin saatiin vahamainen kiinteä aine, jota uutettiin jatkuvasti (Soxhlet) asetonilla (300 ml) 48 h. Tuote eristettiin kuumennuspullon pohjalta sakkana. Kuivauksen jälkeen saatiin tuote eristetyksi valkeana jauheena (5,24 g, 27 %; sp = 246 - 248 °C), ja se karakterisoitiin lähemmin

^{1}H-NMR-spektrin (DMSO-d_6) avulla:

δ 2,42 (s, 6 H); 4,38 (s, 8 H); 6,99 (d, 4 H); 7,40 - 7,49 (m, 6 H); 7,88 (d, 4 H); ja

^{13}C{^{1}H}-NMR-spektrin (DMSO-d_6) avulla:

δ 20,91, 55,55, 122,12, 126,92, 129,88, 135,99, 137,03, 143,30, 154,71; ja sitä kuvaa kaava



Esimerkki B

2,11-diatsa[3,3](2,6)pydinofaanin valmistus

Esimerkissä A valmistettu N,N'-ditosyyli-2,11-diatsa[3,3](2,6)pydinofaani (5,24 g, 9,5 mmol) liuotettiin 90-%:iseen H_2SO_4:oon (48 ml), ja sitä kuumennettiin 2 h lämpötilassa 110 °C samalla sekoittaen. Sen jälkeen kun liuos oli jäähdytetty huoneenlämpötilaan, se laimennettiin hitaasti deionisoidulla vedellä (50 ml) jäähdyttäen sitä samalla jäähauteessa. Tulokseksi saatu liuos kaadettiin sitten 25-%:iseen natriumhydroksidiliuokseen (200 ml), jota jäähdytettiin jäähauteessa. Tulokseksi saatu valkea kiinteä aine uutettiin $CHCl_3$:iin (3 x 100 ml), liuos kuivattiin vedettömällä $MgSO_4$:lla, suodatettiin ja haihdutettiin kuiviin, jolloin saatiin otsikon mukainen tuote vahamaisena kiinteänä aineena (1,69 g, 74 %), ja se karakterisoitiin lähemmin

^{1}H-NMR-spektrin ($CDCl_3$) avulla:

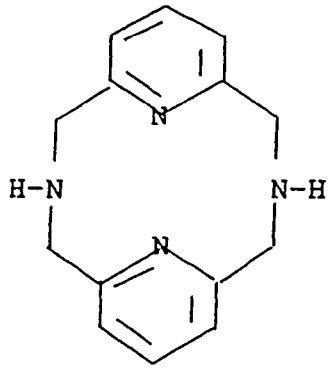
δ 3,91 (s, 8 H); 6,47 (d, 4 H); 7,06 (t, 2 H);

$^{13}C\{^1H\}$-NMR-spektrin ($CDCl_3$) avulla:

δ 55,89, 119,73, 135,71, 159,36; ja

GC-massaspektrin avulla:

m/z = 240 (M^+); ja sitä kuvaa kaava



Esimerkki C

N,N',N''-tritosyyli-2,11,20-triatsa[3,3,3](2,6)pydinofaanin valmistus

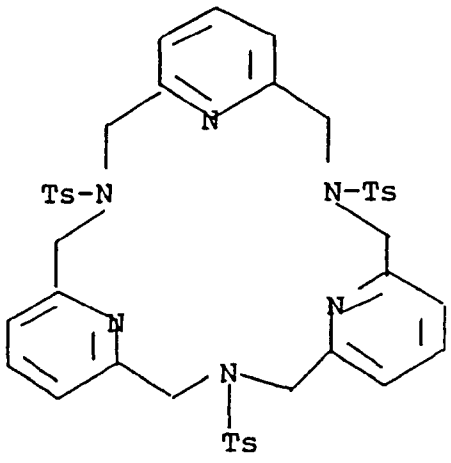
Eristettiin esimerkissä A valmistetun N,N'-ditosyyli-2,11-diatsa[3,3](2,6)pydinofaanin valmistamiseen käytetyn reaktion sivutuotteena (uuttolaitteen "kuppiin" Soxhlet-uuton jälkeen jäänyt osa), sp = 260 - 262 °C, ja se karakterisoitiin lähemmin

^{1}H-NMR-spektrin (DMSO-d_6) avulla:

δ 2,31 (s, 9 H); 4,08 (s, 12 H); 7,01 (d, 4 H); 7,30 (d, 6 H); 7,52 (t, 3 H); ja

^{13}C{^{1}H}-NMR-spektrin (DMSO-d_6) avulla:

δ 20,92, 54,03, 122,55, 127,13, 129,83, 135,12, 136,83, 143,45, 155,47; ja sitä kuvaa kaava



Esimerkki D

2,11,20-triatsa[3,3,3](2,6)pydinofaanin valmistus

Esimerkissä C valmistettu N,N',N''-tritosyyli-2,11,20-triatsa[3,3,3](2,6)pydinofaani (0,5 g, 0,61 mmol) liuotettiin 90-%:iseen H_2SO_4:oon (6 ml), ja sitä kuumennettiin 2 h lämpötilassa 110 °C samalla sekoittaen. Sen jälkeen liuos jäähdytettiin huoneenlämpötilaan ja laimennettiin hitaasti deionisoidulla vedellä (6 ml) jäähdyttäen sitä samalla jäähauteessa. Tulokseksi saatu liuos kaadettiin sitten 25-%:iseen natriumhydroksidiliuokseen (22 ml), joka pidettiin kylmänä jäähauteessa. Tulokseksi saatu valkea kiinteä aine uutettiin $CHCl_3$:iin (3 x 20 ml), liuos kuivattiin vedettömällä $MgSO_4$:lla, suodatettiin ja haihdutettiin kuiviin, jolloin saatiin otsikon mukainen tuote vahamaisena kiinteänä aineena (0,167 g, 76 %), ja se karakterisoitiin lähemmin

^{1}H-NMR-spektrin ($CDCl_3$) avulla:

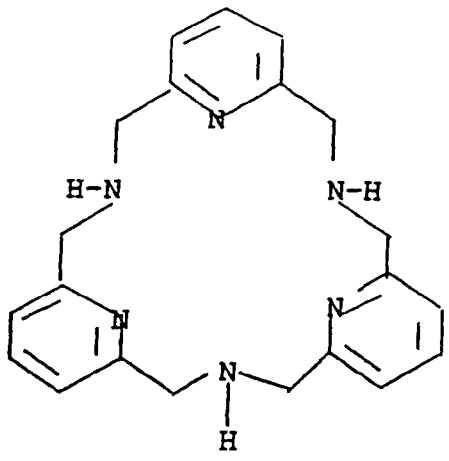
δ 3,03 (s, 3 H); 3,93 (s, 12 H); 7,08 (d, 6 H); 7,54 (t, 3 H);

$^{13}C\{^1H\}$-NMR-spektrin ($CDCl_3$) avulla:

δ 54,58, 120,72, 136,50, 158,64; ja

GC-massaspektrin avulla:

m/z = 360 (M^+); ja sitä kuvaa kaava



Esimerkki E

N,N'-bis(metyleenidimetyylifosfonaatti)-2,11-diatsa[3,3](2,6)pydinofaanin valmistus

Esimerkissä B valmistettu tuote 2,11-diatsa[3,3]-(2,6)pydinofaani (276,4 mg, 1,15 mmol) yhdistettiin paraformaldehydin (138 mg, 4,60 mmol, ylimäärin) ja trimetyylifosfiitin (0,814 ml, 855 mg, 4,60 mmol, ylimäärin) kanssa. Sen jälkeen kun seosta oli sekoitettu varovasti 10 min hyvin sekoittuneen lietteen aikaansaamiseksi, se kuumennettiin lämpötilaan 85 °C ja pidettiin siinä 1 h. Sen jälkeen kun ylimääräiset reagenssit ja sivutuotteet oli poistettu alipaineessa [1 h, 110 °C, 1,3 Pa (0,01 mmHg)], tummaruskea jäännös liuotettiin $CHCl_3$:iin (20 ml) ja pestiin deionisoidulla vedellä (5 x 15 ml). Orgaaninen kerros kuivattiin vedettömällä $MgSO_4$:lla ja suodatettiin ja liuote poistettiin alipaineessa, jolloin saatiin tuote keltaisena vahamaisen aineena (363 mg, 65 %), ja se karakterisoitiin lähemmin

^{1}H-NMR-spektrin ($CDCl_3$) avulla:

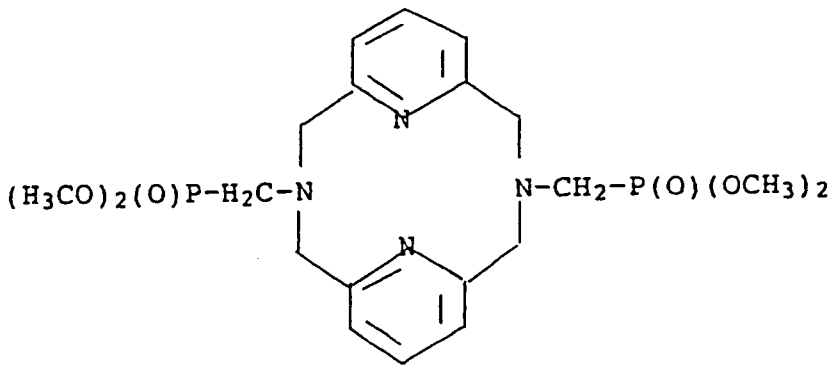
δ 3,39 (d, 4 H); 3,88 (d, 12 H); 4,08 (d, 8 H); 6,84 (d, 4 H); 7,13 (t, 2 H);

$^{13}C\{^1H\}$-NMR-spektrin ($CDCl_3$) avulla:

δ 52,75 (d), 54,88 (d), 65,21 (d), 122,71, 135,69, 157,14; ja

$^{31}P\{^1H\}$-NMR-spektrin ($CDCl_3$) avulla:

δ 27,22; ja sitä kuvaa kaava



Esimerkki F

N,N'-bis(metyleenidietyylifosfonaatti)-2,11-diatsa-[3,3](2,6)pydinofaanin valmistus

Esimerkissä B valmistettu tuote 2,11-diatsa[3,3]-(2,6)pydinofaani (0,47 g, 1,96 mmol) yhdistettiin paraformaldehydin (235 mg, 7,84 mmol, ylimäärin) ja trietyylifosfiitin (1,34 ml, 1,30 g, 7,84 mmol, ylimäärin) kanssa. Sen jälkeen kun seosta oli sekoitettu varovasti 10 min hyvin sekoittuneen lietteen aikaansaamiseksi, se kuumennettiin 1 h:ksi lämpötilaan 90 °C. Sen jälkeen kun ylimääräiset reagenssit ja sivutuotteet oli poistettu alipaineessa [1 h, 125 °C, 1,3 Pa (0,01 mmHg)], tummaruskea jäännös liuotettiin $CHCl_3$:iin (20 ml) ja pestiin deionisoidulla vedellä (5 x 15 ml). Orgaaninen kerros kuivattiin vedettömällä $MgSO_4$:lla ja suodatettiin ja liuote poistettiin alipaineessa, jolloin saatiin tuote keltaisena vahamaisen aineena (957 mg, 91 %), ja se karakterisoitiin lähemmin

^{1}H-NMR-spektrin ($CDCl_3$) avulla:

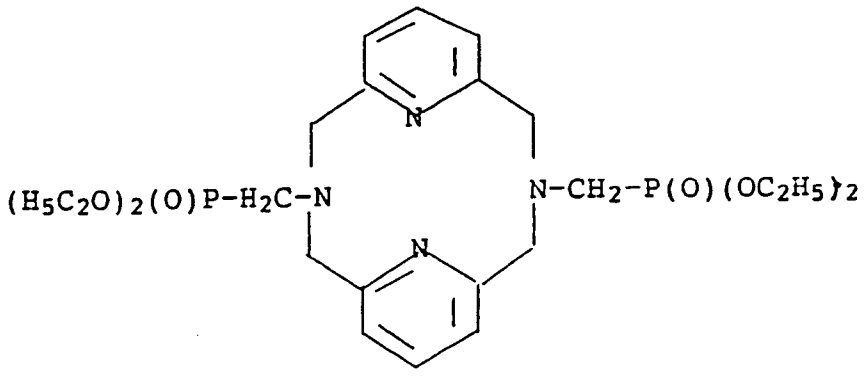
δ 1,24 (t, 12 H); 3,20 (d, 4 H); 3,94 (s, 8 H); 4,07 (q, 8 H); 6,71 (d, 4 H); 6,98 (t, 2 H);

$^{13}C\{^1H\}$-NMR-spektrin ($CDCl_3$) avulla:

δ 16,48, 55,36 (d), 61,75 (d), 65,14 (d), 122,52, 135,41, 157,04; ja

$^{31}P\{^1H\}$-NMR-spektrin ($CDCl_3$) avulla:

δ 24,60; ja sitä kuvaa kaava



Lopputuotteet

Ligandit: Tri- ja dimetyleenikarboksyylihappojen valmistus kaaviossa 1 esitetyllä tavalla.

Esimerkki 1

N,N'-dietikkahappo-2,11-diatsa[3,3](2,6)pydinofaanin (BP2A) valmistus

Esimerkissä B valmistetun 2,11-diatsa[3,3](2,6)pydinofaanin (82,4 mg, 0,58 mmol) vettä sisältävään liuokseen (1 ml), jota sekoitettiin, lisättiin bromietikkahappoa (275 mg, 1,98 mmol, ylimäärin), ja reaktioseoksen pH pidettiin arvon 10 yläpuolella lisäämällä pienissä erissä väkevää NaOH:a, kunnes emästä ei enää tarvittu pH:n pitämiseksi arvon 11 yläpuolella (n. 30 min). Reaktioseosta kuumennettiin (60 °C) sitten 2 h, sen jälkeen reaktioseos jäähdytettiin huoneenlämpötilaan ja sen pH säädettiin arvoon 7. Liuos käsiteltiin sitten kromatografisesti kationinvaihtopylväässä (1,5 x 50 cm, SP-Sepharose™) käyttäen eluenttina ensin deionisoitua vettä ja sen jälkeen 1 M HCl:a. Hapan jae, joka sisälsi tuotetta, haihdutettiin kuiviin, mitä seurasi yhteishaihdutus tuoreen deionisoidun veden (3 x 2 ml) kanssa ylimääräisen HCl:n poistamiseksi. Edellä saadun, väkevän, vettä sisältävän liuoksen kylmäkuivauksen jälkeen lopputuote saatiin eristetyksi valkeana kiinteänä aineena, ja se karakterisoitiin seuraavasti:

^{1}H-NMR-spektri (D_2O): δ 4,17 (s, 4 H); 4,43 (s, 8 H); 7,15 (d, 4 H); 7,66 (t, 2 H).

$^{13}C\{^1H\}$-NMR-spektri (D_2O): δ 61,44, 61,70, 127,46, 146,84, 154,37, 175,62.

Esimerkki 2

N,N',N''-trietikkahappo-2,11,20-diatsa[3,3,3](2,6)-pydinofaanin (TP3A) valmistus

Esimerkissä D valmistetun 2,11,20-triatsa[3,3,3]-(2,6)pydinofaanin (54,5 mg, 0,15 mmol) vettä sisältävään liuokseen (1 ml), jota sekoitettiin, lisättiin bromietikkahappoa (100 mg, 0,72 mmol, ylimäärin), ja reaktioseoksen

pH pidettiin arvon 10 yläpuolella lisäämällä pienissä erissä väkevää NaOH:a, kunnes emästä ei enää tarvittu pH:n pitämiseksi arvon 11 yläpuolella (n. 30 min). Reaktioseosta kuumennettiin (60 °C) sitten 2 h, se jäähdytettiin huoneenlämpötilaan ja sen pH säädettiin arvoon 7. Vettä sisältävä liuos käsiteltiin sitten kromatografisesti kationinvaihtopylväässä (1,5 x 50 cm, SP-Sepharose™) käyttäen eluenttina ensin deionisoitua vettä ja sen jälkeen 1 M HCl:a. Hapan jae, joka sisälsi tuotetta, haihdutettiin kuiviin, mitä seurasi yhteishaihdutus tuoreen deionisoidun veden (3 x 2 ml) kanssa ylimääräisen HCl:n poistamiseksi. Edellä saadun, väkevän, vettä sisältävän liuoksen kylmäkuivauksen jälkeen lopputuote saatiin eristetyksi valkeana kiinteänä aineena, ja se karakterisoitiin seuraavasti:

^{1}H-NMR-spektri (D_2O): δ 4,12 (s, 6 H); 4,68 (s, 12 H); 7,41 (d, 6 H); 7,81 (t, 3 H).

$^{13}C\{^1H\}$-NMR-spektri (D_2O): δ 57,32, 60,53, 128,53, 143,42, 152,42, 171,17.

Ligandit: Dimetyleenifosfonihappojen valmistus kaaviossa 2 esitetyllä tavalla.

Esimerkki 3

N,N'-bis(metyleenifosfonihappo)-2,11-diatsa[3,3]-(2,6)pydinofaanin (BP2P) valmistus

Liuosta (4 ml), joka sisälsi esimerkissä E valmistettua N,N'-bis(metyleenidimetyylifosfonaatti)-2,11-diatsa[3,3](2,6)pydinofaania (255 mg, 0,53 mmol) väkevässä HCl:ssa 37 %), kuumennettiin palautusjäähdytysolosuhteissa 2,5 h. Jäähdytyksen jälkeen liuos haihdutettiin kuiviin, mitä seurasi yhteishaihdutus tuoreen deionisoidun veden (3 x 2 ml) kanssa ylimääräisen HCl:n poistamiseksi. Väkevän vettä sisältävän liuoksen kylmäkuivauksen jälkeen lopputuote saatiin eristetyksi hygroskooppisena ruskeana kiinteänä aineena, ja se karakterisoitiin seuraavasti:

^{1}H-NMR-spektri (D_2O): δ 3,55 (d, 4 H); 4,46 (leveä s, 8 H); 6,90 (d, 4 H); 7,37 (t, 2 H).

$^{13}C\{^1H\}$-NMR-spektri (D_2O): δ 57,80 (d), 63,74 (d), 127,02, 144,18, 152,96.

$^{31}P\{^1H\}$-NMR-spektri (D_2O): δ 11,71.

Ligandit: Dimetyleenifosfonaattipuoliestereiden valmistus kaaviossa 3 esitetyllä tavalla.

Esimerkki 4

N,N'-bis(metyleenifosfonihappoetyyliesteri)-2,11-diatsa[3,3](2,6)pydinofaanin (BP2EP) valmistus

Esimerkissä F valmistettu N,N'-bis(metyleenidietyylifosfonaatti)-2,11-diatsa[3,3](2,6)pydinofaani (957 mg, 1,77 mmol) yhdistettiin 0,1 M KOH:n (7,2 ml) kanssa ja seosta kuumennettiin 16 h lämpötilassa 60 °C. Sen jälkeen liuos jäähdytettiin ja kylmäkuivattiin, jolloin jäi jäännös, joka liuotettiin $CHCl_3$-C_2H_5OH-seokseen (95:5) ja suodatettiin. Liuotteen haihdutuksen ja alipaineessa väkevöinnin jälkeen tuote saatiin eristetyksi vaaleankeltaisena jauheena 657 mg, 66 %), ja se karakterisoitiin seuraavasti:

^1H-NMR-spektri (D_2O): δ 1,10 (t, 6 H); 2,97 (d, 4 H); 3,81 (q, 4 H); 3,84 (s, 8 H); 6,73 (d, 4 H); 7,09 (t, 2 H).

$^{13}C\{^1H\}$-NMR-spektri (D_2O): δ 18,98, 58,76 (d), 63,69 (d), 66,53 (d), 126,35, 140,09, 157,37.

$^{31}P\{^1H\}$-NMR-spektri (D_2O): δ 20,65.

Kompleksit: Metalli-ligandikompleksien valmistus biojakaantumistutkimuksia varten.

Yleinen menettely

Metalli-ligandikomplekseja valmistettiin erilaisin menetelmin. Menetelmät käsittivät metallin ja ligandin sekoittamisen keskenään vettä sisältävässä liuoksessa ja pH:n säätämisen haluttuun arvoon. Kompleksointi tehtiin liuoksissa, jotka sisälsivät suoloja ja/tai puskureita sekä vettä. Joissakin tapauksissa lämmitettyjen liuosten todettiin antavan tulokseksi suurempia kompleksien saantoja kuin toteutettaessa kompleksointi ympäristön lämpötilassa.

Ligandin liuos valmistettiin esimerkiksi liuottamalla ligandi deionisoituun veteen (pH ≈ 2). Ligandimetallikompleksi valmistettiin sitten yhdistämällä ligandiliuos vettä sisältävän $SmCl_3 \cdot H_2O$-liuoksen kanssa ($3 \cdot 10^{-4}$ mol/l 0,1 N HCl:ssa), joka sisälsi $^{153}SmCl_3$-merkkiainetta. Perinpohjaisen sekoituksen jälkeen määritettiin kompleksina esiintyvän metallin prosenttiosuus laskemalla kompleksiliuosnäyte Sephadex™-pylvään läpi, eluoimalla 4:1 fysiologisella suolaliuoksella (0,85 % NaCl/NH_3OH) ja keräämällä jakeet (2 x 3 ml). Radioaktiivisuuden määrää yhdistetyissä eluaateissa verrattiin sitten hartsiin jääneeseen määrään. Näissä olosuhteissa kompleksi poistuu pylväästä eluentin mukana ja kompleksoitumaton metalli pidättyy hartsiin. Kompleksoitumisasteeksi määritettiin tällä menetelmällä tavallisesti vähintään noin 95 %.

Käyttämällä edellä kuvattua menettelyä valmistettiin samariumin kompleksit
N,N'-dietikkahappo-2,11-diatsa[3,3](2,6)pydinofaanin (BP2A) (metallin suhde ligandiin 4:1, 99 %),
N,N',N''-trietikkahappo-2,11,20-diatsa[3,3,3](2,6)pydinofaanin (TP3A) (metallin suhde ligandiin 3:1, 98,6 %),
N,N'-bis(metyleenifosfonihappo)-2,11-diatsa[3,3](2,6)pydinofaanin (BP2P) (metallin suhde ligandiin 3:1, 95 %) ja
N,N'-bis(metyleenifosfonihappoetyyliesteri)-2,11-diatsa[3,3](2,6)pydinofaanin (BP2EP) (metallin suhde ligandiin 4:1, 98 %)
kanssa. Vastaavalla tavalla voidaan kuitenkin valmistaa vastaavia gadoliniumkomplekseja.

Biologinen jakaantuminen

Yleinen menettely

Sprague-Dawley-rottien annettiin mukautua olosuhteisiin 5 vuorokauden ajan, sitten niihin injektoitiin häntälaskimon kautta 100 µl kompleksiliuosta. Injektointihetkellä rotat painoivat 150 - 200 g. 30 minuutin kuluttua rotat tapettiin taittamalla niska ja ruumis leikeltiin.

Kustakin kudoksesta määritettiin radioaktiivisuus NaI-nestetuikelaskurilla, joka oli kytketty monikanavaiseen analysaattoriin. Pulssimääriä verrattiin 100 µl:n standardien pulssimääriin sen prosentuaalisen osuuden annoksesta määrittämiseksi, joka kussakin kudoksessa tai elimessä esiintyi.

Prosenttiosuus annoksesta veressä arvioitiin olettamalla verta olevan 6,5 % ruumiin kokonaispainosta. Prosenttiosuus luussa arvioitiin kertomalla prosenttiosuus reisiluussa 25:llä. Prosenttiosuus lihaksessa arvioitiin olettamalla lihasta olevan 43 % ruumiin kokonaispainosta.

Elimiin jakaantumisen lisäksi kaavan I mukaisten yhdisteiden kelaatteja tutkittiin luuhun paikantumisen tehokkuuden selvittämiseksi, koska fosfonaatit ovat tunnettuja kyvystään sitoutua hydroksiapatiittiin. Näiden testien tulokset on esitetty alla.

Esimerkki I

Tutkittaessa kompleksia ^{153}Sm[N,N'-dietikkahappo-2,11-diatsa[3,3](2,6)pydinofaani] (^{153}Sm-BP2A) saatiin tulokset, jotka on esitetty alla taulukossa I. Luvut edustavat kussakin datapisteessä kahta rottaa 2 tuntia injektoinnin jälkeen.

Taulukko I

^{153}Sm-BP2A:n biojakaantuminen (% injektoidusta annoksesta)

Elin	Keskiarvo
Luu	27,98
Maksa	0,68
Munuainen	0,95
Perna	0,01
Lihas	0,80
Veri	0,43
Sydän	0,02
Keuhko	0,06
Aivot	0,01
Mahalaukku	0,05
Ohutsuoli	0,80
Paksusuoli	0,04

Taulukko I

^{153}Sm-BP2A:lle laskettuja suhteita (keskimääräisiin %-osuuksiin injektoidusta annoksesta perustuen)

Luu/veri	Luu/lihas	Luu/maksa	Luu/perna
65	35	41	2 798

Esimerkki II

Tutkittaessa kompleksia ^{153}Sm[N,N',N''-trietikkahappo-2,11,20-diatsa[3,3,3](2,6)pydinofaani] (^{153}Sm-TP3A) saatiin tulokset, jotka on esitetty alla taulukossa II. Luvut edustavat kussakin datapisteessä yhtä rottaa 2 tuntia injektoinnin jälkeen.

Taulukko II

^{153}Sm-BP2A:n biojakaantuminen (% injektoidusta annoksesta) % injektoidusta

Elin	Annoksesta
Luu	1,495
Maksa	0,570
Munuainen	0,639
Perna	0,068
Lihas	0,833
Veri	0,437
Sydän	0,016
Keuhko	0,047
Mahalaukku	0,036
Ohutsuoli	1,426
Paksusuoli	0,156

Taulukko II

^{153}Sm-TP3A:lle laskettuja suhteita (keskimääräisiin %-osuuksiin injektoidusta annoksesta perustuen)

Luu/veri	Luu/lihas	Luu/maksa	Luu/perna
3	2	3	22

Esimerkki III

Tutkittaessa kompleksia ^{153}Sm[N,N'-bis(metyleenifosfonihappo)-2,11-diatsa[3,3](2,6)pydinofaani] (^{153}Sm-BP2P) saatiin tulokset, jotka on esitetty alla taulukossa III. Luvut edustavat kussakin datapisteessä kolmea rottaa 2 tuntia injektoinnin jälkeen.

Taulukko III

^{153}Sm-BP2P:n biojakaantuminen (% injektoidusta annoksesta)

Elin	Keskiarvo
Luu	60,08
Maksa	3,71
Munuainen	1,21
Perna	0,05
Lihas	1,53
Veri	0,87
Sydän	0,07
Keuhko	0,17
Aivot	0,01
Mahalaukku	0,20
Ohutsuoli	0,39
Paksusuoli	0,13

Taulukko III

^{153}Sm-BP2P:lle laskettuja suhteita (keskimääräisiin %-osuuksiin injektoidusta annoksesta perustuen)

Luu/veri	Luu/lihas	Luu/maksa	Luu/perna
69	39	16	1201

Esimerkki IV

Tutkittaessa kompleksia ^{153}Sm[N,N'-bis(metyleenifosfonihappoetyyliesteri)-2,11-diatsa[3,3](2,6)pydinofaani] (^{153}Sm-BP2EP) saatiin tulokset, jotka on esitetty alla taulukossa IV. Luvut edustavat kussakin datapisteessä kolmea rottaa 2 tuntia injektoinnin jälkeen.

Taulukko IV

^{153}Sm-BP2EP:n biojakaantuminen (% injektoidusta annoksesta)

Elin	Keskiarvo
Luu	39,82
Maksa	5,97
Munuainen	0,74
Perna	0,32
Lihas	1,21
Veri	0,45
Sydän	0,04
Keuhko	0,19
Aivot	0,01
Mahalaukku	0,36
Ohutsuoli	0,33
Paksusuoli	0,25

Taulukko IV

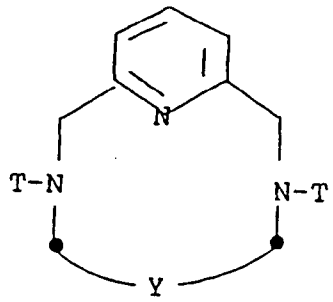
^{153}Sm-BP2EP:lle laskettuja suhteita (keskimääräisiin %-osuuksiin injektoidusta annoksesta perustuen)

Luu/veri	Luu/lihas	Luu/maksa	Luu/perna
88	33	7	124

Keksinnön muut toteutusmuodot selviävät ammattimiehille tästä selityksestä tai sovellettaessa tässä esille tuotua keksintöä käytännössä. Tarkoitus on, että selitystä ja esimerkkejä pidetään ainoastaan selventävinä ja keksinnön todellisen piirin ja hengen osoittavat seuraavat patenttivaatimukset.

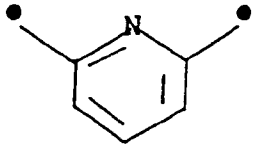
Patenttivaatimukset

1. Makrosykliset tri- ja tetrasyklopolyatsayhdisteet tai niiden farmaseuttisesti hyväksyttävät suolat, t u n n e t u t siitä, että mainituilla yhdisteillä on kaava



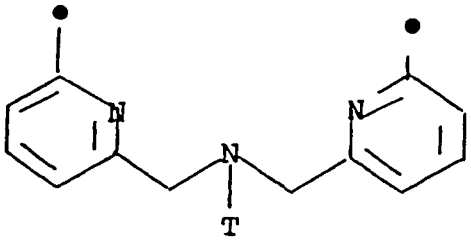
(I)

jossa
Y on joko ryhmä



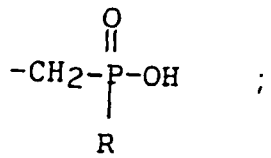
(A)

tai



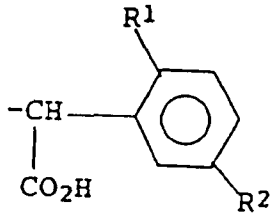
(B)

T on ryhmä $-CH_2-COOH$ tai



;

jossa R on OH-ryhmä, C_{1-5}-alkyyliryhmä tai ryhmä $-O-(C_{1-5}$-alkyyli),
sillä edellytyksellä, että molemmat T-osat ovat samoja, tai toinen T on ryhmä



jossa

R^1 on OH- tai OCH_3-ryhmä ja

R^2 on NO_2-, NH_2-, isotiosyanaatto-, semikarbatsido-, tiosemikarbatsido-, maleimido-, bromiasetamido- tai karboksyyliryhmä.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen yhdiste, t u n n e t t u siitä, että T on ryhmä $-CH_2-P(O)ROH$, jossa R on OH-ryhmä.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen yhdiste tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävä suola, t u n n e t t u siitä, että mainittu yhdiste vastaa kaavaa (IA), sisältää kaksi T-osaa, jotka ovat ryhmiä $-CH_2-P(O)ROH$, jossa R on OH-ryhmä, ja on nimeltään N,N'-bis(metyleenifosfonihappo)-2,11-diatsa[3,3](2,6)pydinofaani.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen yhdiste, t u n n e t t u siitä, että kaikki T:t ovat ryhmiä $-CH_2-COOH$.

5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen yhdiste tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävä suola, t u n n e t t u siitä, että mainittu yhdiste vastaa kaavaa (IA), sisältää kaksi T-osaa, jotka ovat ryhmiä $-CH_2-COOH$, ja on nimeltään N,N'-dietikkahappo-2,11-diatsa[3,3](2,6)pydinofaani.

6. Patenttivaatimuksen 4 mukainen yhdiste tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävä suola, t u n n e t t u siitä, että mainittu yhdiste vastaa kaavaa (IB), sisältää kolme T-osaa, jotka ovat ryhmiä $-CH_2-COOH$, ja on nimeltään N,N',N''-trietikkahappo-2,11,20-diatsa[3,3,3](2,6)pydinofaani.

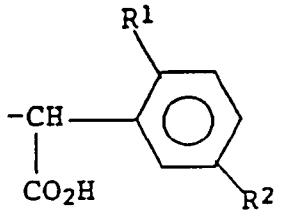
7. Patenttivaatimuksen 1 mukainen yhdiste, t u n n e t t u siitä, että kaikki T:t ovat ryhmiä $-CH_2-P(O)ROH$, jossa R on ryhmä $-O-(C_{1-5}$-alkyyli).

8. Patenttivaatimuksen 7 mukainen yhdiste tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävä suola, t u n n e t t u siitä, että mainittu yhdiste vastaa kaavaa (IA), sisältää kaksi T-osaa, jotka ovat ryhmiä $-CH_2-P(O)ROH$, jossa R on ryhmä $-O-(C_{1-5}$-alkyyli).

9. Patenttivaatimuksen 8 mukainen yhdiste tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävä suola, t u n n e t t u siitä, että R on etoksyyliryhmä ja mainitun yhdisteen nimi on N,N'-bis(metyleenifosfonihappoetyyliesteri)-2,11-diatsa-[3,3](2,6)pydinofaani.

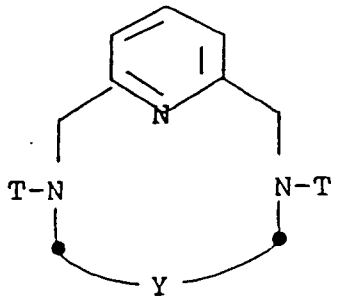
10. Patenttivaatimuksen 1 mukainen yhdiste, t u n n e t t u siitä, että kaikki T:t ovat ryhmiä $-CH_2-P(O)ROH$, jossa R on C_{1-5}-alkyyliryhmä.

11. Patenttivaatimuksen 1 mukainen yhdiste, t u n n e t t u siitä, että yksi T on ryhmä



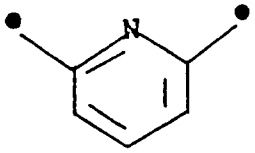
jossa R^1 ja R^2 ovat patenttivaatimuksessa 1 esitettyjen määritelmien mukaisia, ja kaikki muut T:t ovat ryhmiä $-CH_2-COOH$.

12. Kompleksi, t u n n e t t u siitä, että se sisältää makrosyklistä tri- ja tetrasyklopolyatsayhdistettä, jolla on kaava



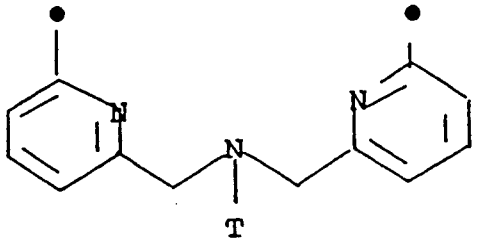
(I)

jossa
Y on joko ryhmä



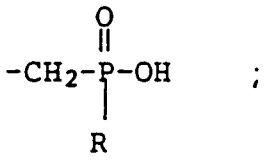
(A)

tai



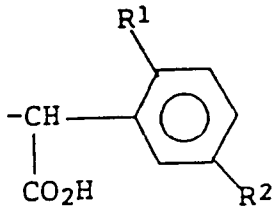
(B)

T on ryhmä $-CH_2-COOH$ tai



;

jossa R on OH-ryhmä, C_{1-5}-alkyyliryhmä tai ryhmä $-O-(C_{1-5}$-alkyyli),
sillä edellytyksellä, että molemmat T-osat ovat samoja, tai toinen T on ryhmä



;

jossa
R^1 on OH- tai OCH_3-ryhmä ja
R^2 on NO_2-, NH_2-, isotiosyanaatto-, semikarbatsido-, tiosemikarbatsido-, maleimido-, bromiasetamido- tai karboksyyliryhmä;
tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävää suolaa kompleksoituna jonkin metalli-ioneista Gd^{3+}, Mn^{2+} ja Fe^{3+} kanssa.

13. Patenttivaatimuksen 12 mukainen kompleksi, t u n n e t t u siitä, että metalli on Gd^{3+}.

14. Patenttivaatimuksen 12 mukainen kompleksi, t u n n e t t u siitä, että kaikki T:t ovat ryhmiä $-CH_2-P(O)ROH$, jossa R on OH-ryhmä, ja metalli on Gd^{3+}.

15. Patenttivaatimuksen 14 mukainen kompleksi, t u n n e t t u siitä, että mainittu yhdiste vastaa kaavaa (IA), sisältää kaksi T-osaa, jotka ovat ryhmiä $-CH_2-P(O)ROH$, jossa R on OH-ryhmä, tai on sellaisen yhdisteen farmaseuttisesti hyväksyttävä suola ja yhdisteen nimi on N,N'-bis(metyleenifosfonihappo)-2,11-diatsa[3,3](2,6)pydinofaani.

16. Patenttivaatimuksen 12 mukainen kompleksi, t u n n e t t u siitä, että kaikki T:t ovat ryhmiä $-CH_2-COOH$ ja metalli on Gd^{3+}.

17. Patenttivaatimuksen 16 mukainen kompleksi, t u n n e t t u siitä, että mainittu yhdiste vastaa kaavaa (IA), sisältää kaksi T-osaa, jotka ovat ryhmiä $-CH_2-COOH$, tai on sellaisen yhdisteen farmaseuttisesti hyväksyttävä suola ja yhdisteen nimi on N,N'-dietikkahappo-2,11-diatsa[3,3](2,6)pydinofaani.

18. Patenttivaatimuksen 16 mukainen kompleksi, t u n n e t t u siitä, että mainittu yhdiste vastaa kaavaa (IB), sisältää kolme T-osaa, jotka ovat ryhmiä $-CH_2-COOH$, tai on sellaisen yhdisteen farmaseuttisesti hyväksyttävä suola ja yhdisteen nimi on N,N',N''-trietikkahappo-2,11,20-diatsa[3,3,3](2,6)pydinofaani.

19. Patenttivaatimuksen 12 mukainen kompleksi, t u n n e t t u siitä, että kaikki T:t ovat ryhmiä $-CH_2-P(O)ROH$, jossa R on ryhmä $-O-(C_{1-5}$-alkyyli), ja metalli on Gd^{3+}.

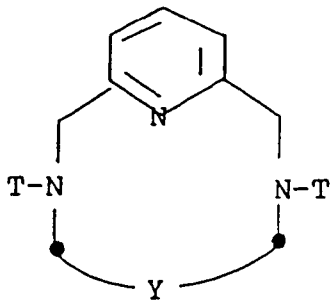
20. Patenttivaatimuksen 19 mukainen kompleksi, t u n n e t t u siitä, että mainittu yhdiste vastaa kaavaa (IA), sisältää kaksi T-osaa, jotka ovat ryhmiä $-CH_2-$

P(O)ROH, jossa R on ryhmä -O-(C_{1-5}-alkyyli), tai on sellaisen yhdisteen farmaseuttisesti hyväksyttävä suola.

21. Patenttivaatimuksen 20 mukainen kompleksi, t u n n e t t u siitä, että R on etoksyyliryhmä tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävä suola ja on nimeltään N,N'-bis(metyleenifosfonihappoetyyliesteri)-2,11-diatsa[3,3]-(2,6)pydinofaani.

22. Patenttivaatimuksen 12 mukainen kompleksi, t u n n e t t u siitä, että kaikki T:t ovat ryhmiä -CH_2-P(O)ROH, jossa R on C_{1-5}-alkyyliryhmä, ja metalli on Gd^{3+}.

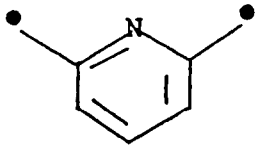
23. Konjugaatti, t u n n e t t u siitä, että se sisältää yhdistettä, jolla on kaava



(I)

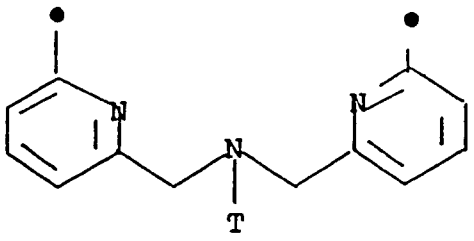
jossa

Y on joko ryhmä



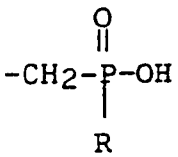
(A)

tai



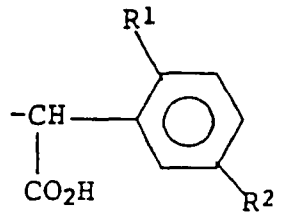
(B)

toinen T on ryhmä -CH_2-COOH tai



;

jossa R on OH-ryhmä, C_{1-5}-alkyyliryhmä tai ryhmä -O-(C_{1-5}-alkyyli),
ja toinen T on ryhmä



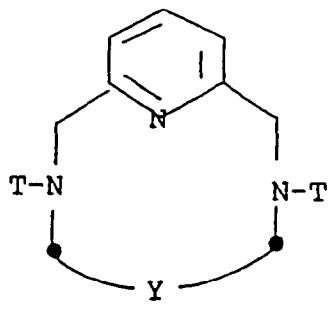
;

jossa
R^1 on OH- tai OCH_3-ryhmä ja
R^2 on NO_2-, NH_2-, isotiosyanaatto-, semikarbatsido-, tiosemikarbatsido-, maleimido-, bromiasetamido- tai karboksyyliryhmä;
tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävää suolaa kompleksoituna jonkin metalli-ioneista Gd^{3+}, Mn^{2+} ja Fe^{3+} kanssa ja sidottuna kovalenttisesti aineeseen, joka on biologisesti aktiivinen.

24. Farmaseuttinen koostumus, t u n n e t t u siitä, että se sisältää jonkin patenttivaatimuksista 12 - 22 mukaista kompleksia ja farmaseuttisesti hyväksyttävää kantaja-ainetta.

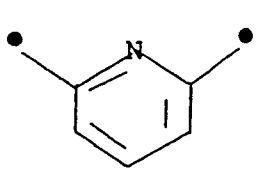
25. Menetelmä diagnoosin tekemiseksi tautitilasta eläimessä, t u n n e t t u siitä, että mainitulle eläimelle annetaan vaikuttava määrä patenttivaatimuksen 23 mukaista koostumusta.

26. Menetelmä makrosyklisten tri- tai tetrasyklopolyatsayhdisteiden, joilla on kaava



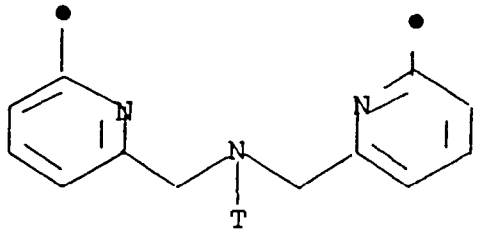
(I)

jossa
Y on joko ryhmä



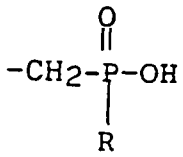
(A)

tai



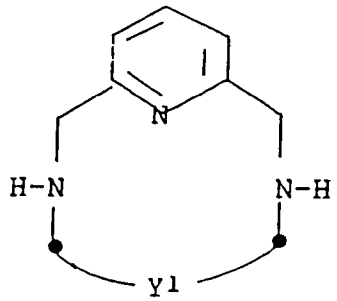
(B)

T on ryhmä $-CH_2-COOH$ tai



;

jossa R on OH-ryhmä, C_{1-5}-alkyyliryhmä tai ryhmä $-O-(C_{1-5}$-alkyyli),
sillä edellytyksellä, että molemmat T-osat ovat samoja;
tai niiden farmaseuttisesti hyväksyttävien suolojen valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että
(A) yhdisteen, jolla on kaava

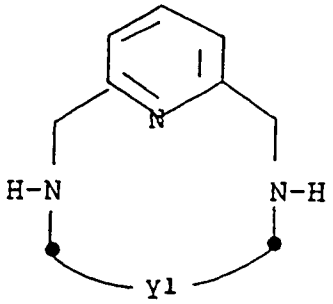


(II)

jossa Y^1 on Y:lle kaavan (I) yhteydessä esitetyn määritelmän mukainen ollessaan ryhmä (A) ja, kun se on ryhmä (B), typpiatomi on substituoitu vedyllä; ja
annetaan reagoida yhdisteen $X-CH_2-COOH$ kanssa, jossa X on kloori- tai bromiatomi, alkalimetallihydroksidin vesiliuoksen läsnä ollessa suunnilleen pH-alueella 8 - 10 ja noin

lämpötilassa 60 - 90 °C yhdisteen aikaansaamiseksi, jolla on edellä esitetty kaava (I) (A):n sisältäessä kaksi T-osaa, jotka ovat ryhmiä $-CH_2-COOH$, ja (B):n sisältäessä kolme T-osaa, jotka ovat ryhmiä $-CH_2-COOH$; tai

(B) yhdisteen, jolla on kaava

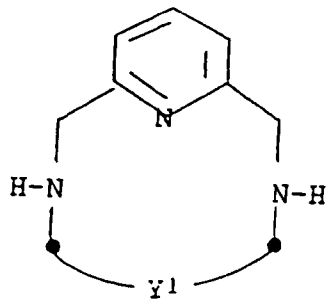


(II)

jossa Y^1 on Y:lle kaavan (I) yhteydessä esitetyn määritelmän mukainen ollessaan ryhmä (A) ja, kun se on ryhmä (B), typpiatomi on substituoitu vedyllä; ja

annetaan reagoida fosforihapokkeen kanssa suolahapossa ja ylimäärässä formaldehydiä pH:ssa, joka on alempi kuin noin 2, ja palautusjäähdytyslämpötilassa yhdisteen aikaansaamiseksi, jolla on edellä esitetty kaava (I) (A):n sisältäessä kaksi T-osaa, jotka ovat ryhmiä $-CH_2-PO_3H_2$, ja (B):n sisältäessä kolme T-osaa, jotka ovat ryhmiä $-CH_2-PO_3H_2$; tai

(C) yhdisteen, jolla on kaava

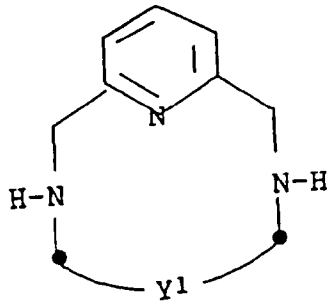


(II)

jossa Y^1 on Y:lle kaavan (I) yhteydessä esitetyn määritelmän mukainen ollessaan ryhmä (A) ja, kun se on ryhmä (B), typpiatomi on substituoitu vedyllä; ja

annetaan reagoida $P(OR)_3$:n kanssa, jossa R on C_{1-4}-alkyyliryhmä, formaldehydissä, mitä seuraa hydrolysointi 3 - 12 M suolahappoa käyttäen pH:ssa, joka on alempi kuin noin 3, palautusjäähdytyslämpötilassa yhdisteen aikaansaamiseksi, jolla on edellä esitetty kaava (I) (A):n sisältäessä kaksi T-osaa, jotka ovat ryhmiä $-CH_2-PO_3H_2$, ja (B):n sisältäessä kolme T-osaa, jotka ovat ryhmiä $-CH_2-PO_3H_2$; tai

(D) yhdisteen, jolla on kaava

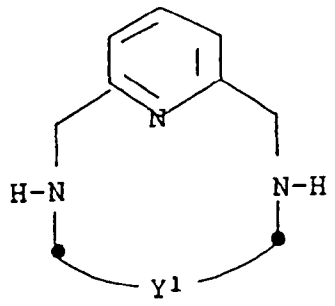


(II)

jossa Y^1 on Y:lle kaavan (I) yhteydessä esitetyn määritelmän mukainen ollessaan ryhmä (A) ja, kun se on ryhmä (B), typpiatomi on substituoitu vedyllä; ja

annetaan reagoida $P(OR)_3$:n kanssa, jossa R on C_{1-4}-alkyyliryhmä, formaldehydissä, mitä seuraa hydrolysointi käyttämällä ylimäärin alkalimetallihydroksidia pH:ssa, joka on korkeampi kuin noin 12, palautusjäähdytyslämpötilassa yhdisteen aikaansaamiseksi, jolla on edellä esitetty kaava (I) (A):n sisältäessä kaksi T-osaa, jotka ovat ryhmiä $-CH_2-PO_2HR$, jossa R on ryhmä $-O-(C_{1-5}$-alkyyli), ja (B):n sisältäessä kolme T-osaa, jotka ovat ryhmiä $-CH_2-PO_2HR$, jossa R on ryhmä $-O-(C_{1-5}$-alkyyli); tai

(E) yhdisteen, jolla on kaava



(II)

jossa Y^1 on Y:lle kaavan (I) yhteydessä esitetyn määritelmän mukainen ollessaan ryhmä (A) ja, kun se on ryhmä (B), typpiatomi on substituoitu vedyllä; ja

annetaan reagoida H_3C-$P(OEt)_2$:n kanssa formaldehydissä ja tetrahydrofuraanissa, mitä seuraa hydrolysointi käyttämällä ylimäärin alkalimetallihydroksidia pH:ssa, joka on korkeampi kuin noin 12, palautusjäähdytyslämpötilassa; tai HP(O)OH-C_2H_5:n kanssa formaldehydissä ja suolahapossa pH:ssa, joka on alempi kuin noin 3, palautusjäähdytyslämpötilassa yhdisteen aikaansaamiseksi, jolla on edellä esitetty kaava (I) (A):n sisältäessä kaksi T-osaa, jotka ovat ryhmiä $-CH_2-PO(OH)R$, jossa R on C_{1-5}-alkyyliryhmä, ja (B):n sisältäessä kolme T-osaa, jotka ovat ryhmiä $-CH_2-PO(OH)R$, jossa R on C_{1-5}-alkyyliryhmä.