



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 697 26 135 T2** 2004.08.26

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 898 574 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 26 135.2**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US97/05692**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 918 519.6**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 97/040055**

(86) PCT-Anmeldetag: **08.04.1997**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **30.10.1997**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **03.03.1999**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **12.11.2003**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **26.08.2004**

(51) Int Cl.7: **C07F 9/6524**

C07F 9/6561, C07F 5/00, A61K 49/04

(30) Unionspriorität:

635142 **19.04.1996** **US**

728339 **09.10.1996** **US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,
LU, MC, NL, PT, SE**

(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:

**Sternagel, Fleischer, Godemeyer & Partner,
Patentanwälte, 51429 Bergisch Gladbach**

(54) Bezeichnung: **FLUORESZIERENDE CHELATE ALS GEWEBESPEZIFISCHE BILDGEBENDE MITTEL**

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 Terbium-, Europium- oder Dysprosium-Chelate, die als Mittel zur Verstärkung des visuellen Kontrastes oder als diagnostische Mittel verwendet werden können.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Die Fluoreszenzdarstellung wird im Herzen einer Vielzahl von chemischen oder biomedizinischen Analyseschemen gefunden. Viele dieser Schemen basieren auf der Einführung einer fluoreszierenden Spezies als ein Marker, Färbemittel, Farbstoff oder Indikator [J.-M. Devoisselle et al., *Optical Engineering* 32(29), 239 (1993); R. P. Haugland und A. Minta, "Design and Application of Indicator Dyes," *Noninvasive Techniques in Cell Biol.*, Herausgeber B. H. Satir, Kapitel 1, Seite 1, (Wiley-Liss, New York, NY, 1990); D. J. Gross, "Quantitative Single Cell Fluorescence Imaging of Indicator Dyes", *Noninvasive Techniques in Cell Biol.*, Herausgeber B. H. Satir, Kapitel 2, Seite 2, (Wiley-Liss, New York, NY, 1990)].

[0003] Organische Chelate, die von Lanthanidionen abgeleitet sind, wurden als sensitive Fluoreszenzmarker für die zeitaufgelösten fluorometrischen Assays immer wichtiger [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)]. Insbesondere sind Terbium- und Europium-Komplexe von wesentlicher Bedeutung für diese Anwendungen wegen der effizienten Fluoreszenzemissionen im sichtbaren Bereich (E. P. Diamandis, US Patent 5,312,922). Beide diese Ionen zeigen eine schwache Fluoreszenzemission in deren nichtkomplexierter Form, jedoch wird die sichtbare Emission dramatisch verstärkt, wenn sie mit einem geeigneten organischen Liganden chelatiert werden. Somit wirkt der organische Ligand als eine Antenne zum Absorbieren von violetter Strahlung und Überführen dieser Energie auf das Metallion, welches dann die absorbierte Energie in Form von sichtbarem Licht abgibt. Die mechanischen Details dieses Phänomens sind gut untersucht und wurden ausführlich dokumentiert [A. P. B. Sinha, *Fluorescence and Laser Action in Rare Earth Chelates/Spectroscopy in Inorganic Chemistry Volume II*, Academic Press, (1971)].

[0004] Es gibt eine Vielzahl von Chelaten, die zur einer langlebenden Fluoreszenz in der Lage sind, jedoch sind nicht alle diese Komplexe für biologische Anwendungen geeignet, ein Grund hierfür liegt in deren Instabilität in wässrigen Medien [G. Kallistratos, *Fluorescent Properties of Aromatic Complexes with Rare Earth and Other Elements of the IIIa-Group/ Chemika Chronika. New Series*, 11, 249–266 (1982)]. Tatsächlich sind eine große Mehrheit von fluoreszierenden Chelaten nur unter nichtwässrigen Bedingung wirksam. Dies liegt vor allem an der Instabilität des Komplexes in wässrigen Lösungen, was dazu führt, dass ein nichtkomplexiertes Metall vorliegt und den Fluoreszenzweg, der für die sichtbare Lichtemission verantwortlich ist, quencht. Letztlich wären Komplexe dieses Typs keine sensitiven Marker bei niedrigen Konzentrationen und würden wegen der Metallablagerung in weichem Gewebe Toxizitätsprobleme in vivo aufwerfen.

[0005] In den letzten Jahren wurde für chelatierende Mittel auf Basis von tetraazamacrocyclischen Grundgerüsten bewiesen, dass sie extrem geeignet sind, wässrige stabile Lanthanidchelate zu generieren. Insbesondere wurde für aminocarboxylat- und aminophosphonat-chelatierende Mittel, die von 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan abgeleitet sind gezeigt, dass sie hochstabile Lanthanidchelate bilden [W. P. Cacheris, A. D. Sherry, *Inorg. Chem.* 26, 958–960 (1987); J. Simon, J. R. Garlich, D. A. Wilson, und K. McMillan, US Patent 4,976,950].

[0006] Die überlegene Natur dieser Klasse von Chelaten hat diese geeignet gemacht für diagnostische und therapeutische medizinische Anwendungen, wie z. B. die Magnetresonanzdarstellung und die Knochenmarksabtragung. Zusätzlich haben bestimmte Typen von solchen makrocyclischen chelatierenden Mitteln, die einen aromatischen Anteil beinhalten, wie z. B. den Pyridinkern, sehr effektive Fluoreszenzeigenschaften mit Terbium und Europium gezeigt (J. Kankare, J. Takalo, und P. Pasanen, US Patent 4,920,195). In diesem Patent haben Kankare et al. gezeigt, dass ein 14gliedriges makrocyclisches Europiumchelate, das einen Pyridinkern enthält, an humanes IgG ankonjugiert werden kann. Das sich ergebende Konjugat enthält somit einen hochsensitiven fluoreszierenden Schwanz (das Chelat), welches durch Fluoreszenz-Immunoassayverfahren quantifiziert werden kann.

[0007] Die Verwendung von paramagnetischen makrocyclischen Chelaten auf Basis auf Gadolinium (Gd) als Kontrastmittel für die Magnetresonanzdarstellung hat beachtenswerte Aufmerksamkeit auf sich gezogen. Die Reaktion der Lanthanidchelate steht in direktem Zusammenhang zu deren kinetischer und thermodynamischer Stabilität unter den anregenden wässrigen Umgebungsbedingungen, die im menschlichen Körper angetroffen werden. Geeignete Modifikationen können an diesem Typ von Ligand gemacht werden, welche eine ausgeprägte Fluoreszenz bewirken, wenn Lanthanide, wie z. B. Terbium (Tb) und Europium (Eu) in dem zentralen Kern vorliegen. Kim et al., *Inorg. Chem.* 34, 2233–43 (1995), haben in einer jüngeren Studie über einige potentielle MRI-Kontrastmittel auf Basis von makrocyclischen pyridinenthaltenden Liganden berichtet. In dieser Studie wurde die Wasserkoordinierung der inneren Sphäre durch Messen der Fluoreszenzeigenschaften der Terbium- und Europium-Chelate bestimmt.

[0008] Die Wichtigkeit von makrocyclischen Lanthanidchelaten für medizinische Anwendungen war mit der

Entwicklung von gewebespezifischen Mitteln kontinuierlich gewachsen. Bislang waren Anwendungen auf die Chelatierung von radioaktiven und paramagnetischen Metallionen für die Therapie und Diagnose fokussiert (J. Simon, J. R. Garlich, D. A. Wilson, K. McMillan, US Patent 4,976,950; Beispiele von Gadoliniumchelaten für MRI sind Prohance™ von Squibb und Dotarem™ von Guerbet). Diese Chelate hatten jedoch keinerlei fluoreszierende Eigenschaften.

[0009] Bisher waren die kommerziellen Anwendungen von fluoreszierenden Chelaten in erster Linie auf das Markieren von Proteinen und Antikörpern für Immunoassays beschränkt [E. P. Diamandis, Clinica Chimica Acta 194, 19–50 (1990); US Patent 5,312,922]. Produkte wie z. B. FIAGEN™ (CyberFluor Inc., Toronto, Ontario, Canada) sind erhältlich und verwenden das Europiumchelate von 4,7-Bis(chlorsulfonyl)-1,10-phenanthrolin-2,9-dicarbonsäure als den fluoreszierenden Marker. Fluoreszenzmarker dieses Typs sind extrem sensitiv und können im subpikomolaren Bereich unter Verwendung von zeitaufgelöster Fluorometrie detektiert werden.

[0010] Eine der wichtigsten Eigenschaften von diagnostischen und therapeutischen Mitteln ist, dass diese die Genauigkeit des Bewertens und Behandelns eines Krankheitszustandes verstärken müssen. Am häufigsten schließt dies das Freisetzen des diagnostischen Mittels an ein spezifisches Organ oder weiches Gewebe ein, worin eine vermutete Abnormalität vorliegen kann. Gegenwärtig erhält das kovalente Anknüpfen eines kleinen Moleküls (z. B. eines diagnostischen oder therapeutischen Fragmentes) an ein großes Protein oder einen Antikörper große Aufmerksamkeit als die Methode der Wahl, um eine Gewebespezifität zu erreichen. Dieses Verfahren ist jedoch in sich komplex und teuer, da es die Verwendung eines spezialisierten Antikörpers einschließt, der an das aktive Mittel angeknüpft sein muss.

[0011] Daher wäre es vorteilhaft, ein diagnostisches Mittel in Form eines kleinen Moleküls zu verwenden, welches in einem spezifischen Gewebe des Körpers lokalisiert werden würde, ohne die Notwendigkeit des Anknüpfens an ein "Beförderungsmolekül" wie z. B. einen Antikörper. Außerdem, wenn ein stabiles fluoreszierendes Lanthanidchelate in der Lage wäre eine Gewebespezifität zu zeigen, wäre es möglich das Vorliegen des Chelates durch Beleuchten mit einer geeigneten Lichtquelle visuell zu bestimmen. Mögliche Anwendungen wären fluoreszenzgeleitete Vorsorgemaßnahmen, in-vivo-Darstellungen von Knochenzellwachstum oder der Morphologie und Untersuchungen des Gastrointestinaltraktes.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0012] **Fig. 1**, eine Photographie, zeigt einen Querschnitt eines Rattendickdarmes mit Tb-PCTMB bei ungefähr 0,01 mmol/kg.

[0013] **Fig. 2**, eine Photographie, zeigt eine vierfache Vergrößerung einer flachen Aufsicht auf das Innere eines Rattendickdarmes mit Tb-PCTMB bei ungefähr 0,01 mmol/kg.

[0014] **Fig. 3**, eine Photographie, zeigt eine zehnfache Vergrößerung eines Knochens einer Ratte mit Tb-BP2P bei ungefähr 100 µl einer 1×10^{-4} M Lösung.

[0015] **Fig. 4**, eine Photographie, zeigt eine vierfache Vergrößerung eines Knochens einer Ratte mit Tb-BP2P bei ungefähr 100 µl einer 1×10^{-4} M Lösung.

[0016] **Fig. 5** ist das Blockdiagramm des mikroendoskopischen Fluorimeters, welches mit Komplexen dieser Erfindung verwendet wurde.

[0017] **Fig. 6**, eine Photographie, ist eine Darstellung des Rattendarms des inneren Lumens, unter Verwendung des Mikroendoskops aus **Fig. 5** und zeigt die aktuelle Fluoreszenzdarstellung und den Falschfarben-Konturplot.

[0018] **Fig. 7**, eine Photographie, ist eine Weißlichtdarstellung desselben Rattendarms aus **Fig. 6**.

[0019] **Fig. 8**, eine Photographie, ist der Ausschnitt einer Darstellung eines Rattenknochens aus dem Femur unter Verwendung des Mikroendoskops aus **Fig. 5** und zeigt die aktuelle Fluoreszenzdarstellung unter Verwendung monochromatischer Anregungen und filtrierter Emission und den Falschfarben-Konturplot. Die Farbenkonturen sind: Grün-gelb = Hintergrundsignal; Blau-purpur = $1,54 \times 10^{-4}$ Mol Tb-PCTMP/Pixel; Rot = $3,35 \times 10^{-15}$ Mol.

[0020] **Fig. 9**, eine Photographie, ist die Weißlicht, reflexendoskopische Darstellung desselben Rattenfemur aus **Fig. 8**.

[0021] **Fig. 10A**, eine Photographie, ist eine Darstellung eines Standardmikroskop von H&E-gefärbtem Gewebe, das aus einer Stelle in dem Kolon genommen wurde, welches entfernt von der fraglichen Masse ist und welches histologisch als normal bewertet wurde.

[0022] **Fig. 10B**, eine Photographie, ist eine Weißlicht, reflexionsmikroskopische Darstellung von ungefärbtem, mit Tb-PTCMB versehenem Gewebe, entnommen aus einer Stelle in dem Kolon, entfernt von der fraglichen Masse (normal).

[0023] **Fig. 10C** ist eine farbkonturverstärkte, fluoreszenzmikroskopische Darstellung von gefärbtem Gewebe, dem Tb-PTCMB zugegeben ist, eine mikroskopische Darstellung von H&E-gefärbtem Gewebe, welches aus einer Stelle in dem Kolon genommen wurde, die von der fraglichen Masse entfernt liegt (normal).

[0024] **Fig. 11A**, eine Photographie, ist eine standardmikroskopische Darstellung von H&E-gefärbtem Gewe-

be, das aus einer Stelle in dem Kolon genommen wurde, die entfernt von der fraglichen Masse liegt und histologisch als ein Adenokarzinoma bewertet wurde.

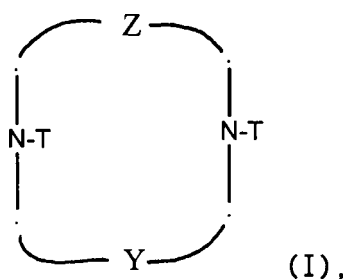
[0025] **Fig. 11B**, eine Photographie, ist eine Weißlicht reflexionsmikroskopische Darstellung von ungefärbtem Gewebe, dem Tb-PTCMB zugegeben wurde, welches aus der fraglichen Kolonmasse genommen wurde (Adenokarzinoma).

[0026] **Fig. 11C** ist eine farbkonturverstärkte, fluoreszenzmikroskopische Darstellung von ungefärbtem Gewebe, dem TB-PTCMB hinzugegeben wurde, genommen aus einer Stelle in der Kolonmasse (Adenokarzinoma).

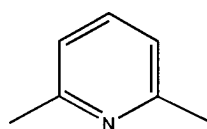
Zusammenfassung der Erfindung

[0027] Die vorliegende Erfindung ist auf neue gewebespezifische Terbium- oder Europium-Chelate gerichtet, die als visuelle diagnostische Mittel verwendet werden können. Insbesondere sind die bevorzugten Chelate aus polyazamacrocyclischen Verbindungen der Formel I, welche einen Pyridinkern entweder als ein Teil des makrocyclischen Grundgerüsts oder als einen anhängenden Ligandenteil enthalten können.

[0028] Die vorliegende Erfindung ist auf neue fluoreszierende Komplexe gerichtet, die Tri- und Tetra-cyclopoliazamacrocyclische Verbindungen und Derivate davon sind, mit der Formel

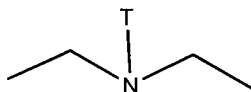


worin:
Z gleich



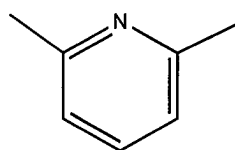
(E)

oder



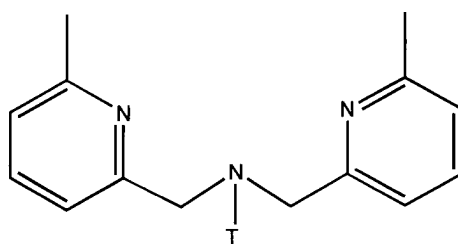
(F)

Y gleich



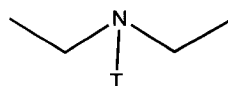
(A)

oder



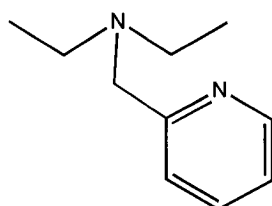
(B)

oder



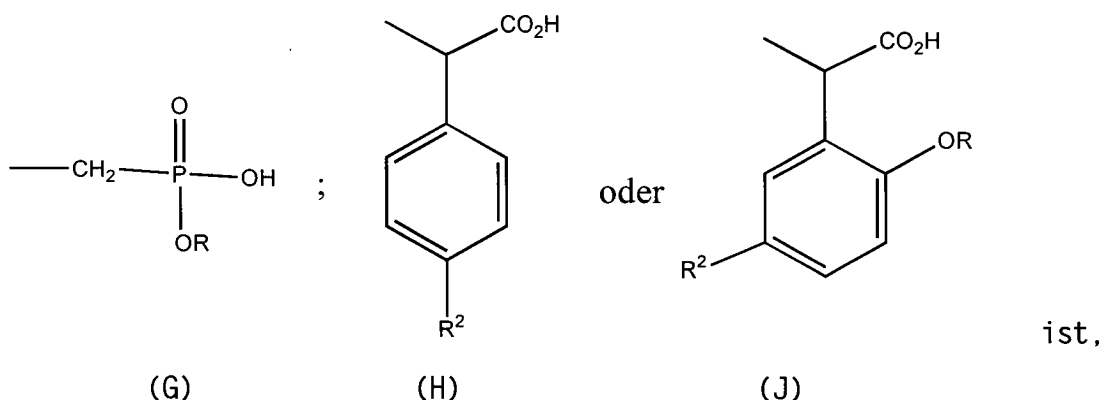
(C)

oder



(D);

T gleich



worin R gleich H, C₁-C₄-Alkyl oder -CH₂CF₃ ist;

R² eine NO₂⁻, NH₂⁻, Isothiocyanat-, Semicarbazid-, Thiosemicarbazid-, Maleimid-, Bromacetamid- oder Carboxylgruppe ist;

unter der Voraussetzung, dass Z nur (F) ist, wenn (D) anwesend ist und Z nur (E) ist, wenn (A), (B) oder (C) anwesend ist;

unter der Voraussetzung, dass, wenn T gleich (H) oder (J) ist, dann nur ein (H) oder (J) vorliegen soll;

in Komplex mit einem Metallion von Terbium (Tb), Europium (Eu) oder Dysprosium (Dy); oder

ein pharmazeutisch annehmbares Salz davon.

[0029] Übliche pharmazeutische Lösungen der Chelate werden zur Herstellung der pharmazeutischen Formulierungen, zur Injektion oder zum Baden oder Waschen des gewünschten Bereiches verwendet.

[0030] Bioverteilungsstudien, die an Sprague-Dawley-Ratten durchgeführt wurden, weisen auf eine Gewebeselektivität hin. Fluoreszenzdarstellungen von Knochen und Intestinalgeweben werden präsentiert und zeigen das Potential zur Verwendung der Lanthanidchelate, um eine ortsgerichtete In-vivo-Darstellung durchzuführen. Es ist auch möglich, den bifunktionalen Liganden oder das Chelat für ein T herzustellen und dann sein Konjugat an biologisch aktives Material herzustellen. Das Chelat [Formel (I), worin ein T gleich (H) oder (J) ist], kann für eine In-vitro-Immunoassay oder eine DNA-Hybridisierung von Gewebeproben (z. B. Blut-, Plasma-, Zellproben) verwendet werden, wobei eine effektive Menge des Chelates mit der Probe zusammengegeben wird und dann die Ergebnisse abgelesen werden.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0031] Die Genauigkeit einer spektroskopischen Darstellung in einem frühen Stadium in weichem Gewebe kann signifikant verbessert werden durch die Verwendung von ortsspezifischen Molekülen (Kontrastmitteln), die sich in einem spezifischen Gewebe anreichern.

[0032] Die Verwendung von Terbium (Tb) oder Europium (Eu) als das zentrale Metallion, um eine gewebespezifische fluoreszierende Probe zu machen, ist sehr ansprechend. Derivate dieses Typs würden für die visuelle Beurteilung von Gewebefbedingungen, wie z. B. die frühe Detektion von Krebs, wertvoll sein und würden nicht von einer Konjugation an ein Protein abhängig sein, um ihr Ziel zu erreichen. Darüber hinaus könnte die Konzentration des aktiven fluoreszierenden Materials begreiflicherweise viel höher sein als in dem Fall von Immunoassays, was die Detektion viel einfacher macht. Die vorliegenden Komplexe haben eine Excitationsbande von 250 bis 290 nm und eine scharfe Emission mit Spitzen bei den Banden von 490 bis 510 nm, 540 bis 560 nm, 590 bis 600 nm und 615 bis 635 nm, eine hohe Quanteneffizienz und Relaxationslebenszeiten im Millisekundenbereich, was eine Signalerfassung nach dem Abklingen der spontanen Gewebeautofluoreszenz erlaubt und die Datenerfassung außerhalb des Bereiches für normale Gewebefluoreszenz erlaubt. Im Gegensatz zu anderen fluoreszierenden Chelaten, die in wässrigen Medien leicht gequencht werden, degeneriert die visuelle Fluoreszenz nicht in Wasser, was diese sehr geeignet macht für die Anwendungen bei der tierischen In-vivo-Darstellung. Darüber hinaus sind Chelate, die von dieser Familie von makrocyclischen Liganden abgeleitet sind, unter den thermodynamisch und kinetisch am stärksten inerten Lanthanidkomplexen eine ausschlaggebende Überlegung für biologische Studien, wobei die Toxizität des Metallions von größter Wichtigkeit ist.

[0033] Die Begriffe, die in Formel (I) und für diese Erfindung verwendet werden, sind im Weiteren wie folgt definiert. "C₁-C₄-Alkyl" schließt sowohl geradkettige, wie auch verzweigt-kettige Alkylgruppen ein. Ein "Tier" schließt ein warmblütiges Säugetier, bevorzugt einen Menschen ein. Wie es hierin verwendet wird, bezieht sich "Komplex" auf einen Komplex der Verbindungen gemäß der Erfindung, z. B. Formel (I), die komplexiert sind mit einem Metallion, wobei wenigstens ein Metallatom chelatiert oder sequestriert ist.

[0034] "Biologisch aktives Material" bezieht sich auf ein Dextran, Peptid oder Moleküle, die eine spezifische Affinität für einen Rezeptor haben, oder bevorzugt auf Antikörper oder Antikörperfragmente.

[0035] "Antikörper" bezieht sich auf irgendeinen polyklonalen, monoklonalen, chimären Antikörper oder einen Heteroantikörper, bevorzugt einen monoklonalen Antikörper; "Antikörperfragment" schließt Fab-Fragmente und F(ab')-Fragmente ein, und irgendeinen Anteil eines Antikörpers mit einer Spezifität gegenüber einem gewünschten Epitop oder Epitopen. Wenn der Begriff "radioaktives Metallchelat/Antikörperkonjugat" oder "Konjugat" verwendet wird, ist gemeint, dass der "Antikörper" ganze Antikörper und/oder Antikörper-Fragmente einschließt, einschließlich semisynthetischen oder genetisch veränderten Varianten davon. Solche Antikörper haben normalerweise eine hochspezifische Reaktivität. Antikörper, die in der vorliegenden Erfindung verwendet werden, können beispielsweise gegen Tumore, Bakterien, Pilze, Viren, Parasiten, Mykoplasmen, Differenzierungs- und anderen Zellmembranantigene, pathogene Oberflächenantigene, Toxine, Enzyme, Allergene, Arzneimittel und irgendwelche biologisch aktiven Moleküle gerichtet sein. Mögliche Antikörper sind 1116-NS-19-9 (Anti-Kolorectal-Karzinom), 1116-NS-3-d (Anti-CEA), 703D4 (Anti-Humanen Lungenkrebs), 704A1 (Anti-Humanen Lungenkrebs) und B73.3. Die Hybridomzelllinien 1116-NS-19-9, 1116-NS-3d, 703D4, 704A1, CC49, CC83 und B72.3 sind bei der American Type Culture Collection hinterlegt, wobei sie dort die Hinterlegungsnummern ATCC HB 8059, ATCC CRL 8019, ATCC HB 8301, ATCC HB 8302, ATCC HB 9459, ATCC HB 9453 und ATCC HB 8108 haben.

[0036] Die bifunktionalen Chelatierungsmittel, die hierin beschrieben sind (dargestellt durch Formel I) können verwendet werden, um die Metallionen zu chelatieren oder zu sequestrieren, so, dass sie Metallionenchelate (auf die hierin auch als "Komplexe" oder "bifunktionale Chelate" Bezug genommen wird) bilden. Diese Komplexe können wegen des Vorliegens des funktionalisierenden Anteils (dargestellt durch R² in Formel I), kovalent an biologisch aktive Materialien gebunden sein, wie z. B. an Dextran, Moleküle, die eine spezifische Affinität für einen Rezeptor haben, oder bevorzugt kovalent an Antikörper oder Antikörper-Fragmente angeknüpft sein. Somit können die Komplexe, die hierin beschrieben sind, kovalent an einen Antikörper oder ein Antikörper-Fragment gebunden sein oder können eine spezifische Affinität für einen Rezeptor haben und auf diese wird hierin als "Konjugate" Bezug genommen.

[0037] "Pharmazeutisch-annehmbare Salze" wie es hierin verwendet wird, meint irgendein Salz oder Mischungen von Salzen einer Verbindung der Formel (I), welche/welches ausreichend untoxisch ist/sind, um für die Diagnose in Tieren, bevorzugt Säugetieren, anwendbar zu sein. Somit sind die Salze im Zusammenhang mit dieser Erfindung anwendbar. Vertreter solcher Salze, die durch Standardreaktionen sowohl von organischen als auch anorganischen Quellen gebildet werden, schließen z. B. Schwefelsäure, Hydrochloresäure, Phosphorsäure, Essigsäure, Bernsteinsäure, Zitronensäure, Milchsäure, Maleinsäure, Fumarsäure, Palmitinsäure, Cholsäure, Palmonsäure, Schleimsäure, Glutaminsäure, Gluconsäure, d-Kamphersäure, Glutarsäure, Glycolsäure, Phthalsäure, Weinsäure, Ameisensäure, Laurinsäure, Sterische Säure, Salicylsäure, Methansulfonsäure, Benzensulfonsäure, Sorbinsäure, Picrinsäure, Benzoessäure, Zimtsäuren und andere geeignete Säuren ein. Außerdem eingeschlossen sind Salze, die durch Standardreaktionen sowohl aus organischen wie auch anorganischen Quellen gebildet werden, wie z. B. Ammonium oder 1-Deoxy-1-(methylamino)-D-glucitol, Alkalimetallionen, alkalische Erdmetallionen, und andere ähnliche Ionen. Insbesondere bevorzugt sind die Salze der Verbindungen der Formel (I), wobei das Salz Natrium, Kalium oder Ammonium ist. Außerdem eingeschlossen sind Mischungen der oben beschriebenen Salze.

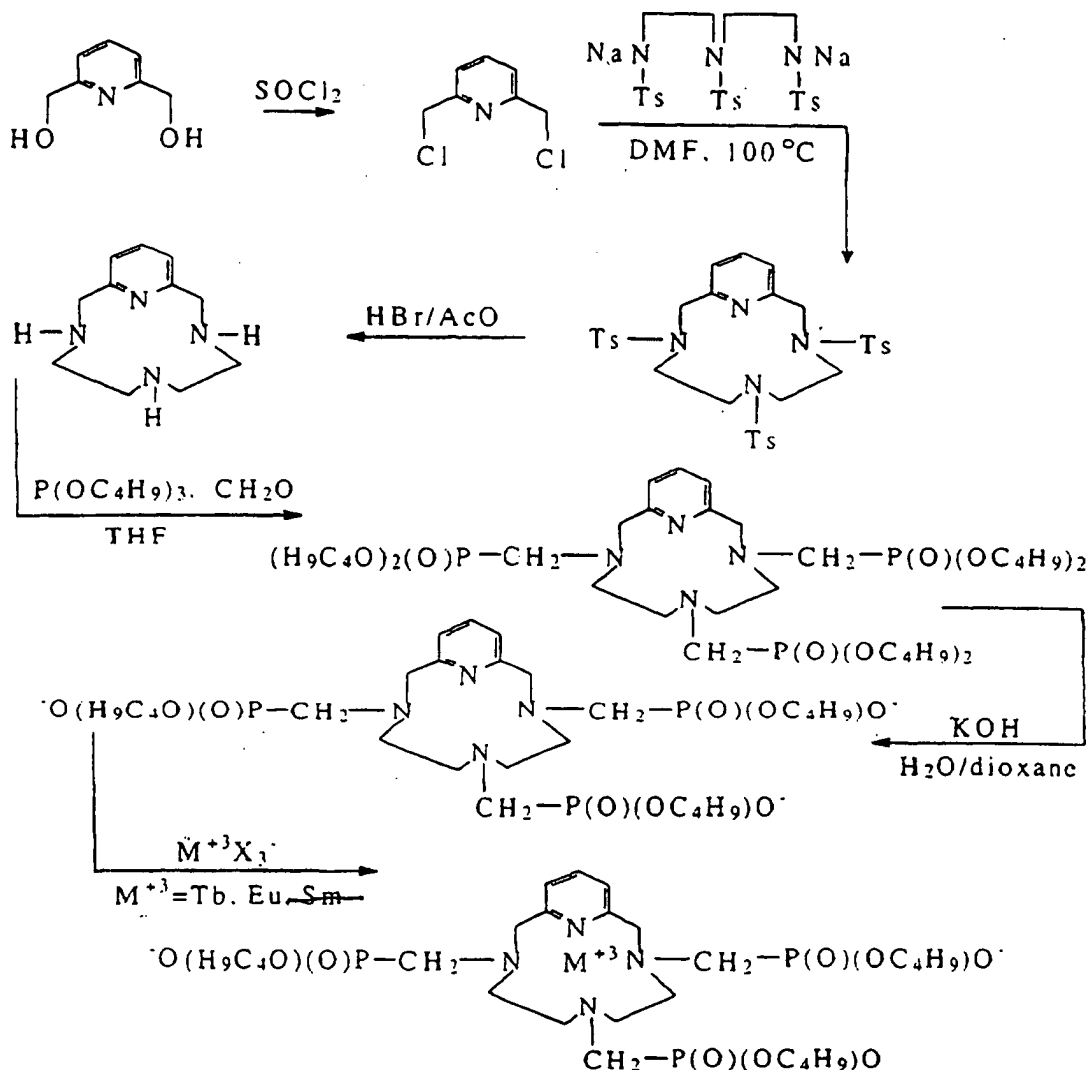
[0038] Selbstverständlich können die freien Säuren der Verbindungen der Formel (I) verwendet werden, ebenso wie die protonierte Form der Verbindungen, z. B. wenn das Carboxylat protoniert ist und/oder die Stickstoffatome, d. h. wenn das HCl-Salz gebildet wird.

Methoden zur Ausführung

[0039] Die Komplexe werden durch Methoden hergestellt, die in der Fachwelt allgemein bekannt sind. Hierfür siehe beispielsweise Chelating Agents and Metal Chelates, Dwyer & Mellor, Academic Press (1964), Kapitel 7. Siehe auch Verfahren zum Herstellen von Aminosäuren in Synthetic Production and Utilization of Amino Acids (herausgegeben von Kameko, et al.) John Wiley & Sons (1974). Ein Beispiel für die Herstellung eines Komplexes schließt die Reaktion einer Bicyclopolyazamacrocyclophosphonsäure mit dem Metallion unter wässrigen Bedingungen bei einem pH von 5 bis 7 ein. Der gebildete Komplex resultiert in einer stabilen Nuklidzusammensetzung, d. h. stabil gegenüber der Dissoziation des Nuklids von dem Liganden.

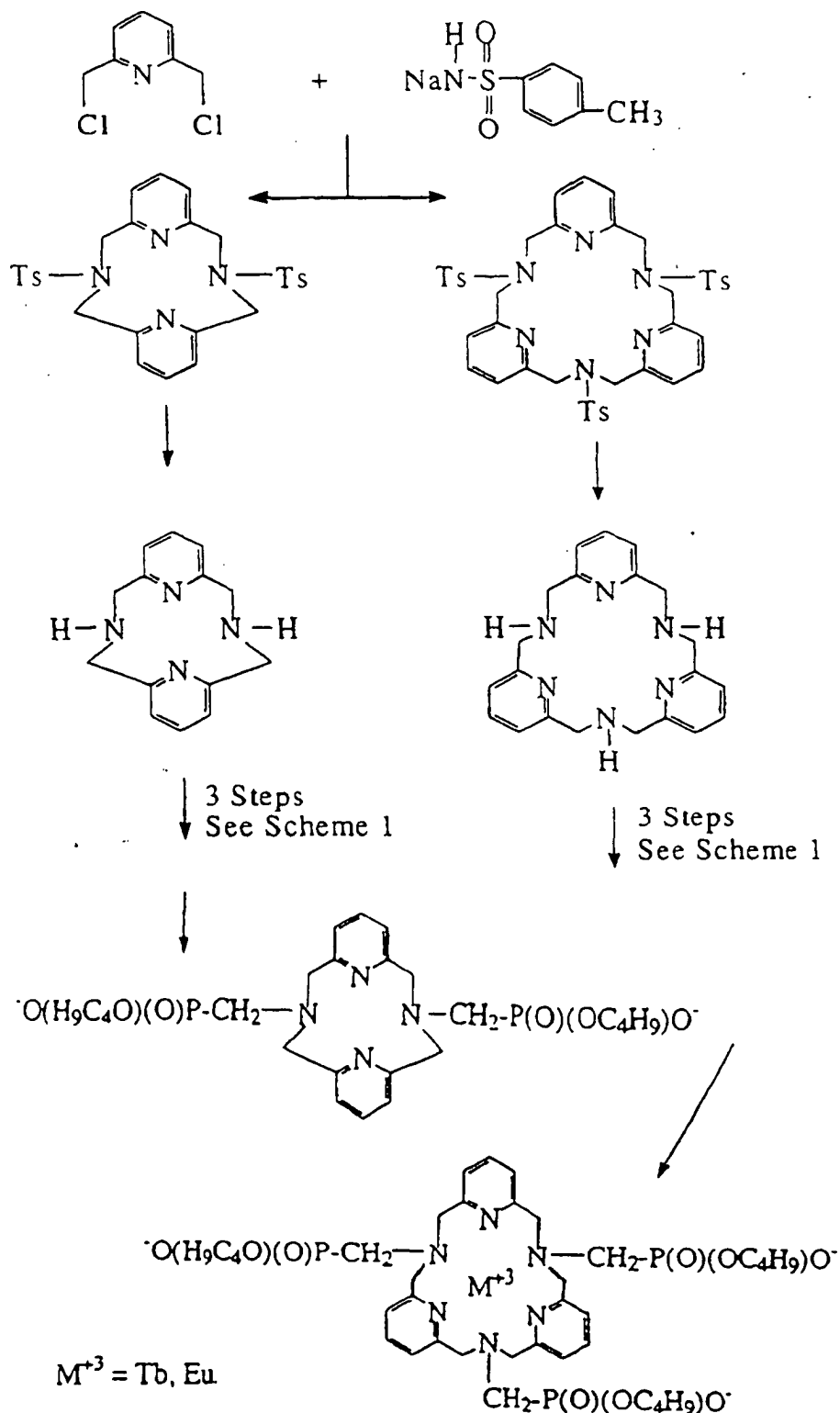
[0040] Die folgenden Schemata 1–3 liefern eine detaillierte Diskussion der Herstellung der Komplexe dieser Erfindung.

Schema 1



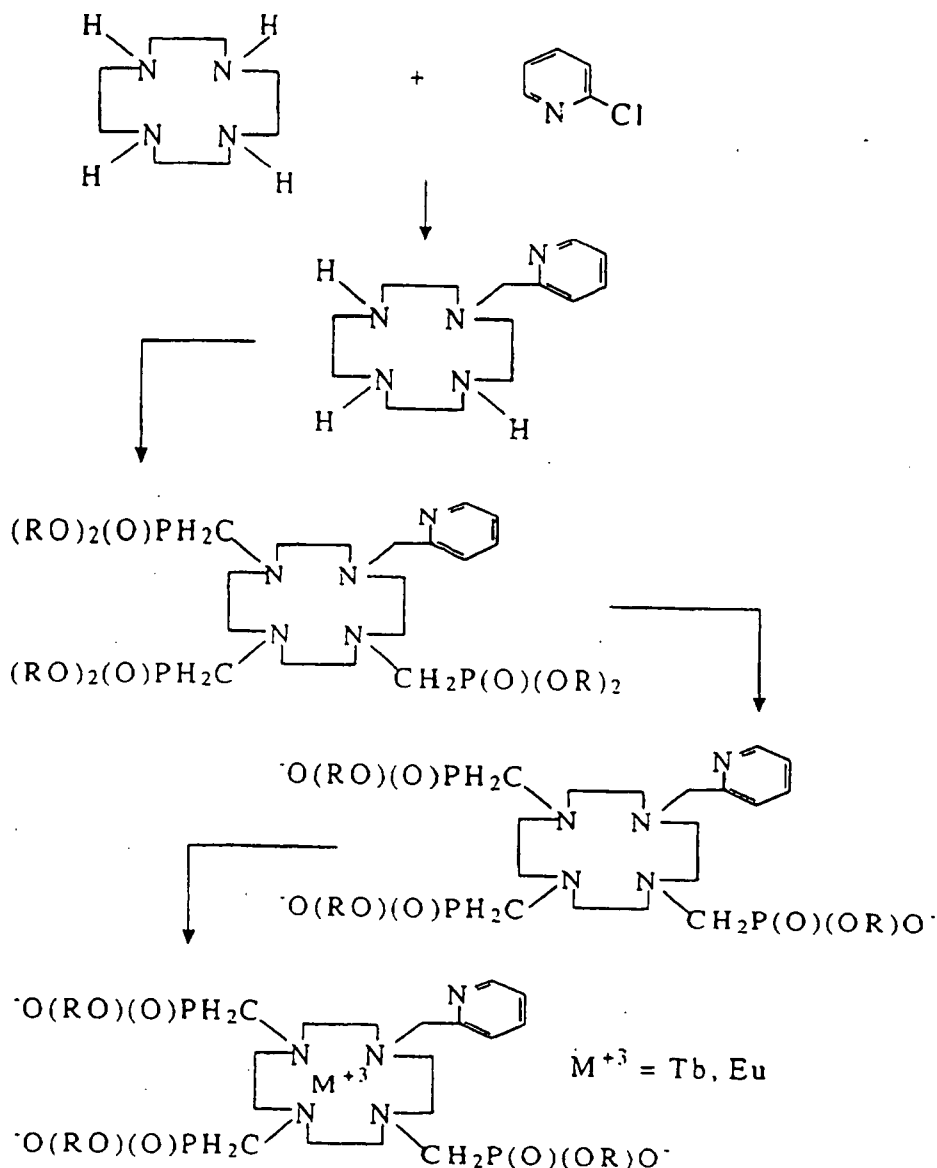
[0041] Schema 1 zeigt die Synthese zur Herstellung der 12gliedrigen Tetraazamacrocyclischen Struktur, die einen Pyridinanteil besitzt. 2,6-Bis(hydroxymethyl)pyridin wird erst in das Chlormethylderivat umgewandelt. In einem getrennten Schritt wird Diethylentetraamin tosyliert und in das Natriumsalz umgewandelt. Diese zwei Reagenzien werden dann in DMF kombiniert, um den N-tosylierten Makrocyclus zu ergeben. Die Entschützung der Amine wird dann durch Erhitzen in einer Mischung von Essigsäure (AcOH) und HBr ausgeführt. Die N-alkylphosphonatester werden dann durch Reaktion der sekundären Amine des Makrocyclus mit einem Trialkylphosphit und Paraformaldehyd in Tetrahydrofuran (THF) synthetisiert. Der sich ergebende Phosphonatester wird dann selektiv unter basischen Bedingungen hydrolysiert, um das Monoalkylphosphonat zu ergeben, was das gewünschte fluoreszierende Chelat gibt, wenn es mit dem Chlorid von Tb, Eu oder Dy behandelt wird.

Schema 2



[0042] Schema 2 zeigt die Synthese der makrocyclischen Strukturen auf, die 2 oder 3 Pyridineinheiten in dem Grundgerüst enthalten. Diese basischen Strukturen werden durch die Behandlung von Bis(Chlormethyl)pyridin mit Toluolsulfonamid hervorgebracht. Diese einzelne Reaktion stellt beide, die 12- und 18-teiligen Makrocyclen her, welche leicht voneinander getrennt werden. Die folgenden Reaktionen, um die fluoreszierenden Chelate herzustellen, sind identisch zu den Schritten, die in Schema 1 aufgezeigt sind.

Schema 3



[0043] Schema 3 beschreibt die Synthese des 12gliedrigen Tetraazamacrocyclus, der einen pyridylanhängenden Anteil besitzt, der an einer der sekundären Stickstoffpositionen angeknüpft ist. Die kovalente Anknüpfung der Pyridyleinheit wird durch die Reaktion von 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan mit 2-Chlormethylpyridin in einem aprotischen Lösemittel, wie z. B. DMF ausgeführt. Die Umwandlung in den gewünschten Ligand und das nachfolgende Chelat wird durchgeführt, wie es in Schema 1 aufgezeigt ist. Die Komplexe der vorliegenden Erfindung werden mit einem molaren Verhältnis von Ligand : Metall von wenigstens ungefähr 1 : 1, bevorzugt von 1 : 1 bis 3 : 1, besonders bevorzugt von 1 : 1 bis 1,5 : 1 verabreicht. Ein großer Überschuss an Ligand ist nicht wünschenswert, da nicht komplexierter Ligand für das Tier toxisch sein kann, oder zu einem Herzstillstand oder zu hypocalcämischen Krämpfen führen kann.

[0044] Bevorzugte Eigenschaften der Verbindungen der Formel (I) sind solche, worin: Wenigstens ein T gleich $-CH_2P(O)(OH)(OR)$ und ein T ein (H) oder (J) Anteil ist.

Ausgangsmaterialien

[0045] Die Liganden der Formel (IA) und (IB) sind aus dem U.S.-Patent 5,385,893, erteilt am 31. Januar 1995, bekannt. Ein anderes publiziertes Äquivalent ist WO 94/26726, veröffentlicht am 24. November 1994.

[0046] Die Liganden der Formel (IC) sind aus unserem ebenfalls anhängigen U.S.-Patent 5,739,294, eingereicht am 06. Mai 1993, bekannt. Ein anderes publiziertes Äquivalent ist WO 93/11802, veröffentlicht am 24. Juni 1993.

[0047] Die Liganden der Formel (ID) sind aus dem U.S.-Patent 5,462,725, erteilt am 31. Oktober 1995 bekannt. Ein weiteres publiziertes Äquivalent ist WO 94/26275, veröffentlicht am 24. November 1994.

[0048] "Komplex" und "Chelat" werden so verwendet, dass sie ein Metallion mit einem Ligand meinen, wie es in Formel (I) gezeigt ist.

[0049] "Eifunktionelles Chelat" bezieht sich auf einen Komplex oder ein Chelat, worin ein T der Formel (I) (H) oder (J) ist.

[0050] $TbCl_3$ und $EuCl_3$ wurden von Aldrich Chemical erworben.

Verwendbarkeit

[0051] Die Komplexe, bifunktionalen Chelate und Konjugate der vorliegenden Erfindung sind als diagnostische Mittel in der Weise verwendbar, wie es beschrieben ist. Diese Formulierungen können in Form eines Kits vorliegen, so dass die zwei Komponenten (z. B. Ligand und Metall, Komplex und Antikörper oder Ligand/Antikörper und Metall) zur geeigneten Zeit vor der Verwendung gemischt werden. Unabhängig davon ob sie bereits vorgemischt sind oder als ein Kit vorliegen, benötigen die Formulierungen üblicherweise einen pharmazeutisch annehmbaren Träger.

[0052] Injizierbare Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung können entweder in Form einer Suspension oder einer Lösung vorliegen. Bei der Herstellung von geeigneten Formulierungen wird erkannt werden, dass im Allgemeinen die Wasserlöslichkeit des Salzes größer ist als die der Säureform. In gelöster Form ist der Komplex (oder wenn es gewünscht ist, die getrennten Komponenten) in einem physiologisch annehmbaren Träger gelöst. Solche Träger umfassen ein geeignetes Lösungsmittel, Konservierungsstoffe, wie z. B. Benzylalkohol, wenn es nötig ist und Puffer. Geeignete Lösungsmittel schließen z. B. Wasser, wässrige Alkohole, Glycole, und Phosphonate oder Carbonatester ein. Solche wässrigen Lösungen enthalten nicht mehr als 50% des organischen Lösungsmittels pro Volumen.

[0053] Injizierbare Suspensionen sind Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung, die ein flüssiges Suspensionsmedium als ein Träger erforderlich machen, mit oder ohne irgendwelche Adjuvantien. Das Suspensionsmedium kann z. B. wässriges Polyvinylpyrrolidon, inerte Öle, wie z. B. pflanzliche Öle oder hochgereinigte Mineralöle, oder wässrige Carboxymethylcellulose sein. Geeignete physiologisch annehmbare Adjuvantien, wenn sie notwendig sind, um den Komplex in Suspension zu halten, können ausgewählt werden aus Verdickern, wie z. B. Carboxymethylcellulose, Polyvinylpyrrolidon, Gelatin und den Alginaten. Viele oberflächenaktive Stoffe sind ebenfalls als Suspensionsmittel verwendbar, z. B. Lecithin, Alkylphenol, Polyethylenoxidadditionsprodukte, Naphthalensulfonate, Alkylbenzonsulfonate und die Polyoxyethylensorbitanester.

[0054] Für injizierbare Anwendungen wird das aktive Chelat mit einer Dosis von ungefähr 0,001 bis ungefähr 0,2 mmol/kg gegeben. Für Anwendungen, bei denen ein Gewebe mit dem fluoreszierenden Chelat vor der Untersuchung gespült wird, kann die Chelatlösung bei der Konzentration abhängig von den spezifischen Anforderungen variieren.

[0055] Die Komplexe, die so gebildet werden können, können an einen Antikörper oder ein Fragment davon angeknüpft sein (kovalent gebunden) und für therapeutische und/oder diagnostische Zwecke verwendet werden. Die Komplexe und/oder Konjugate können für in vivo oder in vitro Anwendungen formuliert sein. Eine bevorzugte Anwendung der formulierten Konjugate ist die Diagnostik von Krankheitszuständen (z. B. Krebs) in Tieren, insbesondere in Menschen.

[0056] Diese Erfindung wird mit einem physiologisch annehmbaren Träger, Arzneimittelträger oder Transportmittel dafür verwendet. Die Verfahren zur Herstellung solcher Formulierungen sind allgemein bekannt. Die Formulierungen werden in Form einer Suspension, einer injizierbaren Lösung oder anderer geeigneter Formulierungen verwendet. Physiologisch annehmbare Suspensionsmedien, mit oder ohne Adjuvantien, können auch verwendet werden.

[0057] Eine "effektive Menge" der Formulierung wird für die Diagnose verwendet. Die Dosis wird abhängig von der Krankheit und den physiologischen Parametern des Tieres, wie z. B. dem Gewicht, variieren. Es wird ebenfalls beabsichtigt, die Formulierungen dieser Erfindung für In-vivo-Diagnostika zu verwenden.

Methoden der Verwendung

[0058] Gewebespezifität kann auch durch ionische oder kovalente Verknüpfung des Chelates an ein natürlich vorkommendes oder synthetisches Molekül (z. B. durch T, welches ein (H) oder (J) enthält, worin R^2 ein NO_2 , NH_2 Isothiocyanat, Semicarbazid, Thiosemicarbazid, Maleimid, Bromacetamid oder eine Carboxylgruppe ist), welches eine Spezifität für das gewünschte Zielgewebe hat, realisiert werden. Eine mögliche Anwendung dieses Ansatzes ist es, durch die Verwendung von mit Chelat konjugierten monoklonalen Antikörpern, welche das Chelat zu dem erkrankten Gewebe transportieren werden, die Visualisierung zu ermöglichen. Der Chirurg kann dann weiches Gewebe mit einer UV-Lichtquelle, die an einen geeigneten Detektor angekoppelt ist, wenn nötig, beleuchten und das indizierte Gewebe chirurgisch entfernen.

[0059] Die Komplexe oder bifunktionalen Chelate, die mit den Verbindungen der Formel (I) dieser Erfindung gebildet werden, werden unter Verwendung eines Verfahrens zur Detektion der Emission dargestellt, welches

die mikroskopische Grenzfläche mit einer Technologie der (hoch) aufgelösten Darstellung kombiniert, um In-vivo-Darstellungen zu erlauben. Ein geeigneter Apparat ist in **Fig. 5** gezeigt. Die Zielprobe (**1**) wird auf das Auflösungs-Trägerobjekt aufgetragen oder durch dieses hindurch angesehen, welches Gruppen von Linien und Elementen hat, die aus einer schwarzen Emulsion gemacht sind, welche auf einen weißen Hintergrund (klares Glas) aufgebracht ist. Bilder werden durch rückwärtige oder vorderseitige Belichtung des Zielobjektes mit einer Quelle (**8**), wie z. B. eine IRgefilterte Xenon-Entladungslampe oder einem flüssigen Lichtleiter mit einer 150 Watt-UV-Lichtquelle beleuchtet. Die Farbe des Lichtes wird elektronisch kontrolliert. Es ist eine schnelle Reaktion möglich und ein einfaches Shiften zwischen der Fluoreszenz und Weißlichtdarstellungen ist möglich. Der Strahl aus der optischen Faser tritt durch einen Diffuser mit einer internen Konstruktion hindurch oder durch einen 270 nm Interferenzfilter (**9**) mit einer 10 nm Bandbreite. Der Abstand zwischen der Mikroskopspitze (linkes Ende von (**2**)) und dem Target (**1**) wird so ausgewählt, dass es das am besten fokussierte Bild gibt. Das Bild wird durch ein endoskopisches Fluoreszenzdarstellungsmikroskop (**2**) gesammelt, welches eine flexible oder geriffelte Transfervorrichtung für die Darstellung enthält, die entweder aus Quarzfaserbündeln oder aus dünnen Stablinsen gemacht ist. Ein optisches Fasermikroskop zur Fluoreszenzdarstellung ist flexibel; ein Mikroskop zur Fluoreszenzdarstellung mit Stablinsen ist starr, aber hat einen besseren Lichtdurchsatz. Die beste Auflösung, die für diese Erfindung verwendet wird, hat eine optische Faserleitung mit 10.000 Pixeln, welche jeweils 3 µm im Durchmesser hat. Das beste kommerziell erhältliche Fluoreszenzdarstellungsmikroskop wäre bevorzugt zu verwenden, welches mehr als 20.000 Pixel hat, welche jeweils 3 µm im Durchmesser messen. Die Darstellung kann aus verschiedenen Sichtwinkeln, bezogen auf die zentrale Sichtachse des mit dünnen Stablinsen versehenen Endoskopes gesammelt werden. Ein 10 × Mikroskopobjektiv (**3**) wird 10 mm von dem Skop (**2**) eingesetzt, welches die Darstellung sammelt, vergrößert und in eine ladungsgekoppelte Vorrichtung (CCD, (**5**)) eingespielt, welche thermoelektrisch gekühlt sein kann. Ein Interferenzfilter (**4**) liegt zwischen dem Mikroskopobjektiv (**3**) und dem CCD (**5**), so wie z. B. ein 520 nm oder 550 nm Filter, wenn das Fluoreszenzbild erhalten wird. Beispiele für diese Interferenzfilter sind zwei Positionsfilterräder (wenn kein Filter vorliegt oder Weißlicht), ein Flüssigkristallfilter (welcher sehr spezifisch ist, Cambridge Research Instrument), oder ein Monochrometer. Die Darstellung, die durch das CCD gesammelt wird, wird auf einem hochauflösenden Videomonitor (**7**) angezeigt, welcher die Darstellung zur visuellen Anzeige in Echtzeit liefert, wird aufgegriffen durch einen "Framegrabber" und auf einen PC (**6**) zur Bildverarbeitung und zur Analyse heruntergeladen oder auf einer Videokassette (VCR) zur nachfolgenden Digitalisierung aufgenommen. Eine Kamerakontrolleinheit (CCU) kann zwischen dem Monitor (**7**) und dem PC (**6**) vorliegen. Die Software stellt einen Graph der Lichtintensität als eine Funktion der Position zwischen den Linienpaaren her. Dieses digitalisierte Bild liefert eine Grauskaladarstellung. Die limitierende Auflösung (LP/mm) wird unter Verwendung eines Bereichdarstellungs-Modulationsplots (AIM) berechnet. Dieses Verfahren vereinfacht die nichtinvasive Quantifizierung des Transportprozesses unter konstanter Lichtintensität und bei einer festgelegten Vergrößerung. Dies ist die bevorzugte Methode, die mit den Komplexen dieser Erfindung verwendet wird.

[0060] Es sind auch andere Verfahren bekannt, die ebenfalls verwendet werden können, wie z. B. das endoskopische Darstellungssystem, das in dem U.S.-Patent 5,507,287 beschrieben ist.

Theorie der Erfindung

[0061] Ohne an die Theorie gebunden werden zu wollen, wird angenommen, dass die vorteilhaften Ergebnisse der vorliegenden Erfindung erhalten werden, weil all den Chelaten dieser Erfindung gemein ist, dass das Kation an einer apikalen Position oberhalb des 12-gliedrigen Makrocyclus positioniert ist und durch eine ionische Interaktion mit einer phosphonsäureligierenden Gruppe gehalten wird. Es ist diese einzigartige Kombination von funktionalisierten Stickstoffpositionen und ligierenden Gruppen innerhalb des makrocyclischen Netzwerkes, welche chemische Modifikationen dazu befähigt, zu Gewebeselektivität zu führen.

[0062] Die Fluoreszenz von Lanthanidsalzen wie z. B. Tb und Eu in wässriger Lösung ist sehr schwach, da die Ionen die notwendige Energie nicht effizient absorbieren. Jedoch kann die Fluoreszenz dieser Ionen dramatisch verstärkt werden, wenn das Metall mit einem geeigneten organischen Liganden komplexiert wird.

[0063] In diesem einzigartigen Komplex absorbiert der Ligand UV-Strahlung und wird von dem Grundzustand (S_0) in einen angeregten Zustand (S_1) angeregt. Wenn der Ligand beginnt in seinen ursprünglichen Grundzustand zurückzukehren, wird einige der Energie von dem Tripletzustand des Liganden auf ein geeignetes 4f-Energielevel des Lanthanidions übertragen. Wenn das Ion Energie aus dem Tripletzustand des Liganden erhält, kommt es in den Resonanzzustand und kann eine Strahlungstransition durchlaufen, welche in der charakteristischen Linienemission des Metallions (Ionenfluoreszenz) resultiert. In diesen Chelatstrukturen wirkt der Ligand im Wesentlichen als eine Antenne zum Absorbieren von Energie, welche auf das Metallion übertragen wird und in Form von sichtbarem Licht wieder abgegeben wird. Es ist auch vorteilhaft einen Liganden zu haben, der Energie bei einer signifikant unterschiedlichen Wellenlänge absorbiert als die, welche von dem Metallion ausgesendet wird, um die Interferenz zu minimieren (Stoke's shift).

[0064] Es wurde über eine Vielzahl von fluoreszierenden Chelaten berichtet. Eine große Mehrheit dieser Che-

late sind nur in nichtwässrigen Medien wirksam, da ihre Fluoreszenz durch Wasser gequenchet wird. Die Chelate der vorliegenden Erfindung sind für biologische Anwendungen wegen ihrer Fähigkeit stabile, fluoreszierende Chelate in einer wässrigen Umgebung zu bilden, weit überlegen. Die einzigartige Positionierung der Pyridinfunktionalität als entweder Teil des makrocyclischen Ringes oder als eine anhängende Gruppe, erlaubt einen effizienten Energietransfer auf das Metallion und verstärkt die gesamte Chelatstabilität.

[0065] Die Erfindung wird bei einer Betrachtung der folgenden Beispiele weiter deutlich, von denen beabsichtigt ist, dass sie lediglich exemplarisch für die vorliegende Erfindung sein sollen.

Chelatsynthese

Beispiel 1: Herstellung von Terbium-3,6,9-tris(methylenphosphonsäure)-3,6,9,15-tetraazabicyclo[9.3.1]pentadeca-1(13),11,13-trien(Tb-PCTMP)

[0066] Die freie Säure von 3,6,9-tris(methylenphosphonsäure)-3,6,9,15-tetraazabicyclo[9.3.1]pentadeca-1(13),11,13-trien(PCTMP) (50 mg, 0,1 mmol) wurde als erstes in deionisiertem Wasser gelöst (1 ml), um eine wässrige Lösung mit pH = 1, 3 zu ergeben. Es wurde dann Terbiumchloridhexahydrat (38 mg, 0,1 mmol) in Wasser (1 ml) gelöst und in einer Portion zu der Ligandlösung unter andauerndem Rühren gegeben (pH = 1,4). Es wurde dann Natriumhydroxid (0,1 N) in 50 µl-Portionen zugegeben, bis ein pH = 5,5 erhalten wurde. Die Komplexierung wurde durch ein Reversphasen-HPLC, welches mit Methanol/Wasser (80 : 20) eluiert, überwacht. Die Lösung wurde dann durch ein 0,2 µm Filter gefiltert und gefriergetrocknet, um den Komplex als einen flockigen weißen Feststoff zu ergeben, welcher eine brillantgrüne sichtbare Emission aufwies, wenn er mit einer UV-Lampe angeregt wurde. Die Komplexierung wurde durch HPLC bewertet und die Ausbeute war quantitativ.

Beispiel 2: Herstellung von Terbium-N,N'-bis(methylenphosphonsäure)-2,11,diaza[3,3]-(2,6)pyridinophan (Tb-BP2P)

[0067] Eine wässrige Lösung (3 ml) von N,N'-bis(methylenphosphonsäure)-2,11,diaza[3,3]-(2,6)pyridinophan (BP2P)freier Säure (80,8 mg, 0,19 mmol) wurde mit einer wässrigen Lösung (3 ml) von Terbiumchloridhexahydrat (85 mg, 0,23 mmol) unter Rühren kombiniert (pH = 4). Es wurde dann in kleinen Aliquots (20 µl) Kaliumhydroxid (5 N) zugegeben, bis die Lösung basisch war (pH = 9). Nach Rühren über 18 Stunden wurde die Lösung gefiltert (0,45 µm) und gefriergetrocknet. Der sich ergebende Feststoff wurde in Methanol (16 ml) gelöst und gefiltert, um Tb(OH)₃ zu entfernen. Das Methanolfiltrat wurde in vacuo konzentriert, um einen Feststoff zu ergeben, welcher in Wasser (10 ml) gelöst, filtriert (0,2 µm) und gefriergetrocknet wurde. Der Komplex wurde als ein flockiger, weißlicher Feststoff isoliert. Die Komplexierung wurde durch HPLC bewertet und die Ausbeute war quantitativ.

Beispiel 3: Herstellung von Europium-3,6,9-tris(methylenphosphonsäure-n-butylester)-3,6,9,15-tetraaza-bicyclo[9.3.1]pentadeca-1(15),11,13-trien(Eu-PCTMB)

[0068] Das Kaliumsalz von PCTMB (150 mg, 0,19 mmol) wurde in deionisiertem Wasser (3 ml) gelöst, um eine Lösung von pH = 10,5 zu ergeben. Der pH wurde durch Verwendung von 1 N HCL unter kontinuierlichem Rühren auf 5,5 erniedrigt. Eine wässrige Lösung (3 ml) von Europiumchloridhexahydrat (85,5 mg, 0,23 mmol) wurde dann in einer Portion zugegeben, um eine Lösung mit einem pH von 3,47 zu ergeben. Der pH wurde langsam durch Zugabe von 0,1 ml Aliquots von 0,1 N KOH erhöht. Die Zugabe von KOH wurde beendet, als ein pH von 6,4 erreicht war. An diesem Punkt wurde die homogene Lösung seifig und es wurde eine beachtliche Trübung beobachtet. Die trübe Lösung wurde dann gefriergetrocknet und der sich ergebende Feststoff in Chloroform : Methanol (3 : 1, 40 ml) gelöst. Diese organische Lösung wurde durch Celite™ gefiltert und konzentriert, um einen glasigen Feststoff zu ergeben. Der Feststoff wurde in Wasser (20 ml) wieder gelöst, durch einen 0,2 µm Filter gefiltert und gefriergetrocknet, um den Komplex in Form eines schuppigen, schneeweißen Feststoffes zu ergeben. Der Komplex wurde als ein flockiger weißlicher Feststoff isoliert. Die Komplexierung wurde durch HPLC bewertet und die Ausbeute war quantitativ.

Beispiel 4: Herstellung von Terbium-3,6,9-tris(methylenphosphonsäure-n-butylester)-3,6,9,15-tetraaza-bicyclo[9.3.1]pentadeca-1(15),11,13-trien (Tb-PCTMB)

[0069] Das Kaliumsalz von PCTMB (150 mg, 0,19 mmol) wurde in deionisiertem Wasser (3 ml) gelöst, um eine Lösung von pH 10,5 zu ergeben. Der pH wurde durch Verwendung von 1 N HCL unter kontinuierlichem Rühren auf 5,5 erniedrigt. Eine wässrige Lösung (3 ml) von Terbiumchloridhexahydrat (85,5 mg, 0,23 mmol) wurde dann in einer Portion zugegeben, um eine Lösung mit einem pH von 3,47 zu ergeben. Der pH wurde

langsam durch Zugabe von 0,1 ml Aliquots von 0,1 N KOH erhöht. Die Zugabe von KOH wurde beendet, als ein pH von 6,4 erreicht wurde. An diesem Punkt wurde die homogene Lösung seifig und es wurde eine beachtliche Trübung beobachtet. Die trübe Lösung wurde dann gefriergetrocknet und der sich ergebende Feststoff in Chloroform : Methanol (3 : 1, 40 ml) gelöst. Diese organische Lösung wurde durch Celite™ gefiltert und konzentriert, um einen glasigen Feststoff zu ergeben. Der Feststoff wurde in Wasser (20 ml) wieder gelöst, durch einen 0,2 µm Filter gefiltert und gefriergetrocknet, um den Komplex in Form eines schuppigen, schneeweißen Feststoffes zu ergeben. Der Komplex wurde als ein flockiger, weißlicher Feststoff isoliert. Die Komplexbildung wurde durch HPLC bewertet und die Ausbeute war quantitativ.

Beispiel 5: Herstellung von Dyspersium-3,6,9-tris(methylenphosphonsäure-n-butylester)-3,6,9,15-tetraaza-bicyclo[9.3.1]pentadeca-1(15),11,13-trien (Dy-PCTMB)

[0070] Wenn das Vorgehen aus Beispiel 4 wiederholt wurde, wobei das geeignete Metallchlorid verwendet wurde, wurde das entsprechende Chelat erhalten.

Bioverteilungsstudien

[0071] Die Details der Gewebe-Bioverteilungsstudien sind wie folgt. Eine $^{153}\text{SmCl}_3$ -Lösung wurde als die geeigneten Ligandlösungen hergestellt. Die zwei Lösungen wurden bei einem pH = 2 gründlich gemischt und der pH der Lösung wurde unter Verwendung von 0,1 N NaOH auf 7 erhöht, um die Komplexbildung zu erleichtern. Die Komplexbildung wurde dann bewertet, indem die Probenlösung (100 µl) durch eine Sephadex™C-25-Säule passieren gelassen wurde, mit einem Eluieren (2 × 3 ml), mit 4 : 1 Saline (0,85% NaCl/NH₄H) und durch Vergleichen der Menge an Radioaktivität in dem Eluat mit der verbleibenden auf der Säule (freies Metall verbleibt auf der Säule). Die In-vivo-Verteilung der radioaktiven Komplexe wurde unter Verwendung von 3 Sprague-Dawley-Ratten (180–220 g) gemessen, wobei jede mit 100 µl (pH = 7,5) der radioaktiven Komplexlösung injiziert worden war. Nach 30 Minuten oder 2 Stunden wurden die Tiere getötet. Die Organe wurden entfernt, gewogen und ausgezählt. Der gesamte Prozentanteil der Dosis im Knochen wurde unter Verwendung der Standardannahmen hinsichtlich der gesamten Körpergewichtsanteile errechnet. Z. B. stellt eine Knochenprobe (Femur) 1/25stel des Gewichtes des gesamten Skelettsystems dar und eine Gesamtmuskeldosis wurde berechnet durch Annahme, dass ein Muskel 43% des gesamten Körpergewichtes umfasst.

Bilddarstellung

Beispiel I

[0072] Sprague-Dawley-Ratten (180 bis 220 g) wurden mit den entsprechenden Tb-Chelaten mit 0,1 mmol/kg Dosismengen injiziert. Die Tiere wurden getötet und die Organe für die spektroskopische Untersuchung entfernt. Es wurden dann Photographien unter Verwendung eines Mikroskops durch Belichten der Gewebeproben, die das Tb-Chelat enthielten, mit einer 254 nm von Hand gehaltenen UV-Lampe, die mit einem sichtbaren Filter ausgestattet war, aufgenommen. Die **Fig. 3** und **4** zeigen Bereiche aus dem Rattenfemur, worin hohe Konzentrationen des Chelats vorliegen, wie es durch intensive Grünemission bewiesen ist. Die **Fig. 3** und **4** zeigen als das Chelat Tb-BP2P. Die Verteilung des Chelats scheint ungefähr gleichmäßig zu sein und kann in porösen Regionen des Knochens nachgewiesen werden, in denen die Kapillarblutversorgung reichlich ist. Die Emission scheint an den Knochenendregionen intensiver zu sein, was mit schnell wachsendem Gewebe in jungen Tieren übereinstimmend wäre.

[0073] Diese Komplexe zeigen eine deutliche Gewebeselektivität zusätzlich zu einzigartigen spektroskopischen Eigenschaften. Anionisches Tb-PCTMP und Tb-BP2P zeigen eine Skelettsystemaufnahme; neutrales Tb-PCTMB zeigt einen im Wesentlichen lipophilen Charakter. Tb-PCTMB verstärkt die Interaktionen zwischen dem Chelat und Blutproteinen, was zu einer wesentlichen hepatobiliären Aufnahme führt. Da die Ratten keine Gallenblase haben, wird das Chelat direkt in den Gastrointestinaltrakt transportiert. Daher konzentriert sich Tb-PCTMB in dem Dünndarm, Tb-BP2P siedelt sich in erster Linie in dem Knochen an. Die **Fig. 1** und **2** zeigen diese Ergebnisse für Tb-PCTMB.

[0074] Auf Basis dieser Ergebnisse scheint es möglich, dass diese Chelanten verwendet werden können, um Abnormalitäten, die in Tieren, wie z. B. einem Menschen, mit Krankheiten, wie z. B. Osteoporose zu detektieren und, da diese in Blut und anderen wässrigen Medien löslich sind, können sie auch für die Flüssigkeitsbewegung in biologischen Matrices verwendet werden.

Beispiel II

[0075] Die quantitative, multidimensionale, entfernte, mikroendoskopische Bilddarstellung von Ratten-Dünn-

darm in vivo wurde unter Verwendung von Tb-PCTMB (hergestellt in Beispiel 1) ausgeführt. Die optische Ausrichtung erlaubt eine räumliche Darstellung auf der Mikronebene und eine Sensitivität auf der Pikogrammebene.

[0076] Ein Blockdiagramm des mikroendoskopischen Fluorimeters, das verwendet wurde, ist in **Fig. 4** gezeigt. Die Probe wurde entfernt beleuchtet durch einen Flüssiglichtleiter mit einer 150 Watt-UV-Lichtquelle, gekoppelt an einen 270 nm Interferenzfilter mit einer 10 nm Bandbreite. Fluoreszenzdarstellungen wurden mit einer 210 nm Hopkins-dünnen Stablinse gesammelt. Die Darstellung von dem Skop wird durch einen 550 nm Interferenzfilter mit einer 10 nm Bandbreite durchtreten gelassen und wird dann auf einen thermoelektrisch gekühlten CCD überspielt. Das CCD-Signal wird auf einem Personal Computer angezeigt und Rasterbilder werden mit einer begleitenden Kontrollsoftware für die Kamera abgegriffen. Eine quantitative Darstellungsanalyse wird unter Verwendung einer geeigneten Software gemacht. Die gesamte apparatische optische Ausrichtung hat ein Blickfeld von 415 mm² mit einer Auflösung in der Größenordnung von 181 LP/mm.

[0077] Die instrumentelle Kalibrierung wird durch das Infundieren einer bekannten Quantität von Tb-PCTMB in eine hochreflektive, fibröse, feste Matrix geschafft, die eine ähnliche Morphologie hat wie die des Gewebes, welches untersucht werden soll. Die Kalibrierungsstandards und die Gewebeprobe werden in der gleichen Position im Verhältnis zu dem Skop montiert. Die Standards werden auf sechs Filterpapierscheiben eines analytischen Grades, 5 mm im Durchmesser, vorbereitet. Die wässrigen Lösungen des Tb-PCTMBs werden mit den folgenden Konzentrationen hergestellt: 3×10^{-6} M, 4×10^{-6} M, 5×10^{-6} M, 6×10^{-6} M, 7×10^{-6} M, 8×10^{-6} M. Es werden auf getrennte Scheibchen 5 µL jeder der Tb-PCTMB-Lösungen aufgebracht. Wenn sie trocken sind, hat jede der Scheiben 15, 20, 25, 30, 35 bzw. 40 pmol des Tb-PCTMBs darin infundiert. Die Standardscheibchen werden in den Probenhalter platziert, mit 270 nm Licht angeregt und hinsichtlich der Fluoreszenz bei verschiedenen CCD-Integrationszeiten (3 bis 6 Sekunden) abgefragt. Das Fluoreszenz-Signal von jedem der Scheibchen wird gegen die Anzahl an Molen des Tb-PCTMBs und der Kameraintegrationszeit aufgetragen. Diese Diagramme zeigen Kalibrationskurven von Molen gegen Zeit und Molen gegen Grauskalasinale.

[0078] Gewebeprobe, die den Probenmarker (Tb-PCTMB) enthalten, werden von Sprague-Dawley-Ratten (180 bis 220 g) erhalten, die mit 100 µL der Lösungen von Tb-PCTMB-Komplex (pH = 7,5, 6×10^{-6} M) in die Schwanzsehne injiziert worden waren. Die injizierte Menge der Verbindung ist grob genommen äquivalent zu 1 mg Tb-PCTMB je kg Rattenkörpergewicht. Nach 30 Minuten wurde das Tier getötet und der Dünndarm wurde entfernt. Ein kleiner Darmabschnitt, der 3 mg wog, wurde in den Probenhalter mit Montierwachs montiert und unter Verwendung eines CCD bei verschiedenen Integrationszeiten bildlich dargestellt. Zusätzlich zu dem Fluoreszenzbild, das gesammelt wurde (**Fig. 5**) wurde ein Weißlichtbild der Darmprobe gesammelt (**Fig. 6**), wobei eine 150 Watt Weißlichtquelle für die Beleuchtung verwendet wurde, bei der der Emissionsfilter entfernt war. Die Fluoreszenzdarstellung wurde quantifiziert und die Menge an Tb-PCTMB wurde auf Basis des hergestellten Kalibrierungsdiagramms bestimmt.

Quantitative Ergebnisse

[0079] Die Gewebeprobe wird als homogen und lang im Vergleich zu der Penetrationstiefe (δ) der Anregungsquelle betrachtet. Die Probe hat einen Absorptionskoeffizienten, einen Streukoeffizienten und eine Streuungsanisotropie (μ_a , μ_s , bzw. g). Dies ist ein eindimensionales Modell auf Basis einer Monte-Carlo-Simulation, die die Flussrate und die Ausstiegsfunktion unter Berücksichtigung der exponentiellen Abschwächung des Lichtes aus der Quelle behandelt und die Abhängigkeit des Lichttransportes durch die Oberflächengrenze erklärt. Die Annahmen schließen ein, dass das Anregungslicht normal gleichmäßig auf die Oberfläche und weit in Bezug auf die Penetrationstiefe aufgebracht ist und dass die Lichtverteilung nur in der Penetrationstiefe variiert. Die Fluoreszenzrate (Φ) und die Ausstiegsfunktion (G) sind wie folgt gegeben:

$$\Phi(z) = E_0[C_1 \exp(-k_1 z/\delta) - C_2 \exp(-k_2 z/\delta)]$$

$$G(z) = C_3 \exp(-k_3 z/\delta),$$

worin z die Tiefe des Quellenfluorophors ist und C_1 , C_2 , C_3 , k_1 , k_2 und k_3 Parameter sind, die von dem Diffusionsreflexionsvermögen, R_d abhängen. Empirische Ausdrücke für diese Parameter sind:

Berechnete Parameter zur Abschätzung der Ausstiegsfunktion für das Fluoreszenzsignal

Parameter	η Gewebe / η Luft	Berechneter Wert
R_d	$\text{Exp}(-7\delta\eta_a)$	0,42
C_1	$3,09 + 5,44R_d - 2,12\text{exp}(-21,5R_d)$	5,37
k_1	$1 - (1 - 1/\sqrt{3})\text{exp}(-20,1R_d)$	1,00
C_2	$2,09 - 1,47R_d - 2,12\text{exp}(21,5R_d)$	1,47
k_2	$1,63\text{exp}(3,40R_d)$	6,80
C_3	$0,28 + 0,78R_d - 0,14\text{exp}(-10,7R_d)$	0,61
k_3	$1 - 0,31\text{exp}(-6,12R_d)$	0,98

[0080] Die quantitativen Ergebnisse erfordern eine Kalibrierung des Mikroendoskopfluorimeters in zwei Gesichtspunkten: (1) Verwendung einer Grauskala, um das Fluoreszenzsignal als eine Funktion der Analytmenge zu messen und (2) Generieren von zeitlichen Antwortkurven auf die Detektorintegrationszeit als eine Funktion der Signalintensität für festgelegte Mengen des Analyts. Unter Verwendung der Standardscheibchen, die mit Tb-PCTMB infundiert waren, zur Kalibrierung des Mikroendoskopfluorimeters wurde ein lineares, quantitatives Verhältnis zwischen dem Fluoreszenzsignal (integriert für 4 Sekunden) und den Molen an Tb-PCTMB hergestellt: $I = 4,58 Q - 49,0$; $r = 0,994$, worin Q die Quantität von Tb-PCTMB in Molen ist und I das Fluoreszenzsignal ist, welches der durchschnittliche Grauskalenwert in der Bilddarstellung ist. Der durchschnittliche Grauskalenwert korreliert mit dem durchschnittlichen Fluoreszenzsignal pro Kamerapixel. Die Probenscheiben für die Kalibrierung waren 13.000 Pixels im Querschnitt, welches die Bildgröße der Scheibe war. Da wir durchschnittliches Signal pro Pixel messen, wurden andere Justierungen gemacht, um die Quantität des Analyts in einer Probe zu machen, die in der Größe anders ist als 13.000 Pixel, durch Generieren eines Kalibrierungsplots aus durchschnittlichem Signal pro Pixel (Grauskalenwert) gegen Mole an Analyt pro Pixel.

[0081] Eine Weißbilddarstellung des Dünndarms ist in **Fig. 7** gezeigt und das entsprechende Fluoreszenzbild ist in **Fig. 6** gezeigt. Die Bilddarstellungen sind grauskaliert von 0 bis 255, wobei niedrige Grauskalenwerte dunklen Regionen in den Bilddarstellungen entsprechen und hohe Werte deren Lichtregionen (hochreflektierende Morphologie) entsprechen. Ein Falschfarbenplot ist in **Fig. 6** gezeigt, welcher die Bestimmung der Quantität von Tb-PCTMB an jedem Punkt in der Gewebeprobe durch Feststellen der Farbe einer Region, die interessiert und das Herausfinden der entsprechenden Tb-PCTMB-Quantität je Pixel Farbskala erlaubt. Zum Beispiel wird der Darm aus **Fig. 6**, einem Falschfarbenplot, in einer ersten Annäherung in drei Teile aufgeteilt, die hinsichtlich der gesamten Menge an vorliegendem Tb-PCTMB berechnet werden. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle wiedergegeben:

Ergebnisse der quantitativen Berechnungen von Tb-PCTMB

Probe der Region	Mittlere Grauskala	Probenpixel	Grauskala korrigiert	Gesamt mole an Tb-PCTMB
1	85,66	1976	69,73	$1,63 \times 10^{-11}$
2	77,18	228	62,83	$1,43 \times 10^{-11}$
3	67,94	684	55,30	$1,23 \times 10^{-11}$

[0082] Diese Ergebnisse zeigen unsere Fähigkeit, das Vorliegen eines Probenmarkers in einer komplexen biologischen Matrix auf der Pikomolebene zu quantifizieren.

[0083] Die Bioverteilungsdaten für PCTMB sind in der Tabelle unten gezeigt. Diese Daten wurden unter Verwendung von Sprague-Dawley-Ratten durchgeführt. Das radioaktive Metall, ^{153}Sm wird in dem Komplex mit PCTMB verwendet. Eine Stocklösung von $^{153}\text{SmCl}_3$ wurde hergestellt durch Zugabe von 2 ml von $3 \times 10^{-3}\text{M}$ $^{153}\text{SmCl}_3$ in 0,1 N HCl zu 2 ml von $3 \times 10^{-4}\text{M}$ $^{152}\text{SmCl}_3$ Trägerlösung. Eine geeignete Ligandenlösung wurde dann in deionisiertem Wasser hergestellt. Nachdem die zwei Lösungen gründlich gemischt wurden ($\text{pH} = 2$),

wurde der pH langsam auf 7 unter Verwendung von 0,1 N NaOH erhöht, um die Komplexbildung zu erleichtern. Die Komplexbildung wurde dann durch Durchlaufenlassen der Probenlösung (100 ml) durch eine Sephadex™ C-25-Säule, wobei mit 4 : 1 Saline (0,85% NaCl/NH₄OH) eluiert (2 × 3 ml) wird und Vergleichen der Menge der Radioaktivität in dem Eluat zu der, die auf der Säule bleibt (freies Metall bleibt auf der Säule) bewertet. Die Ratten wurden dann mit dem Komplex wie zuvor injiziert, nach 30 Minuten getötet, und deren Organe entfernt. Die radioaktiven Counts aus dem Gewebe ergaben die Menge an Chelat in jedem dieser Gewebetypen.

Bioverteilung von ¹⁵³Sm-PCTMB

Gewebe aus Organ	Prozent verteilt
Knochen	3,73
Leber	2,70
Niere	0,43
Milz	0,05
Muskel	1,09
Blut	0,14
Herz	0,02
Lunge	0,04
Gehirn	0,00
Magen	0,08
Dünndarm	57,98
Dickdarm	0,77

[0084] Die Summe der Werte ist nicht gleich 100%, weil die verbleibende Fraktion durch das Exkretionssystem ausgetreten ist oder in Geweben aufgenommen wurde, die nicht analysiert wurden. Die 3-mg-Probe des Gewebes kam aus der dosierten Ratte (0,1 mmol/kg Körpergewicht) und die Gesamtmenge an Analyt, welches sich in dem Dünndarm ansiedelt, ist nur 58 der gesamten Menge, die injiziert wurde. Daher ist eine einfache Massenbalanceberechnung positiv.

[0085] Diese Daten sind aufgeschrieben in Bezug auf die Masse des analysierten Organs, und in dem Dünndarm war die Ratte injiziert mit einer Menge von 0,1 mmol Probe je kg Dünndarm. Die genommene Probe war ein 3-mg-Abschnitt und bei Verwendung der geeigneten Umwandlungsfaktoren sollten ungefähr 193 Pikomole des Probenmoleküls in der Probe sein. In **Fig. 6** kommt das Fluoreszenzsignal von ungefähr 23% der gesamten Dünndarmoberfläche (was bedeutet, dass 44,39 Pikomole in der Probe quantifiziert sein sollten). Die gesamte Menge des Analyts, die gefunden wurde, war 43,02 Pikomole (3,18% Fehler), was ermutigend ist, wenn man die kleine Probe und die kleine Menge an Analyt berücksichtigt. Diese Detektionsgrenze zeigt ein großes Potenzial für eine früh warnende, minimal invasive Diagnose in Echtzeit.

Beispiel 3

[0086] Der optische Aufbau, der verwendet wurde, ist in **Fig. 5** dargestellt. Für die Auflösungsstudien wurde ein 1951 USAF Auflösungszielobjekt verwendet. Das Auflösungszielobjekt besteht aus einer Gruppe von Elementen (Linien), die mit einer bekannten Breite, Länge und Distanz voneinander vorliegen. Die Linien auf dem Zielobjekt sind aus einer schwarzen Emulsion gemacht, die auf einem weißen, positiven Hintergrund (klares Glas) aufgebracht ist. Die Bilddarstellungen werden erhalten, indem das Auflösungszielobjekt unter Verwendung einer IR-gelichteten Xenonentladungslampe von hinten beleuchtet wird. Der Strahl aus einer optischen Faser tritt durch einen Diffuser einer internen Konstruktion hindurch, welcher den 270 nm Interferenzfilter (**4**), der in **Fig. 5** gezeigt ist, ersetzt. Der Abstand zwischen der Mikroskopspitze von dem Zielobjekt (1,5 mm) wurde so gewählt, dass das am besten fokussierte Bild hergestellt wurde. Die Bilddarstellung wurde bei einem 0°, 30° und 60° Sichtwinkel in Bezug auf die Zentralachse des dünnen Stablinsenendoskops gesammelt. Ein 10 × Mikroskopobjektiv, 10 mm von dem Endoskop entfernt platziert, sammelte, vergrößerte und spielte die Dar-

stellung auf einen CCD (5). Die Bilddarstellung, die von dem CCD gesammelt wurde, wurde auf einem hochauflösendem Videomonitor dargestellt, von einem Framegrabber aufgegriffen und auf einen PC für die Bild-Bearbeitung und -Analyse heruntergeladen. Die Software stellt eine graphische Darstellung der Lichtintensität als eine Funktion der Position durch die Linienpaare dar. Die begrenzende Auflösung (LP/mm) wird unter Verwendung eines Bereich-Bild-Modulations(AIM)-Plots berechnet und ist definiert als der Punkt, bei dem der dl/dx konstant bleibt.

[0087] Die Sichtfeldmessungen wurden durch Repositionieren des Zielobjektes durchgeführt, so dass eine einzelne Linie das Sichtfeld des Endoskopes lateral durchspannt. Das zirkuläre Sichtfeld wird einfach berechnet in Kenntnis der Länge der Linie auf dem Auflösungszielobjekt, die den Durchmesser der Sichtzone darstellt. Auf Kosten der Bildgenauigkeit kann das Sichtfeld vergrößert werden, was erlaubt, das große Segmente des Knochens sichtbar gemacht werden. Für die Fluoreszenzmessungen war der Abstand zwischen dem Skop und der Knochenprobe ungefähr 5 mm. Das am besten fokussierte Bild wurde gefunden, wenn das Mikroskopobjektiv nahe seines Arbeitsabstandes und bei 21 mm vom unteren Ende des Stabliniensystems platziert wurde.

[0088] Bioverteilungsstudien wurden wie in Beispiel II beschrieben durchgeführt unter Verwendung des entsprechenden ^{153}Sm -PCTMP-Komplexes. Ungefähr 1 mg/kg an gelöstem Stoff wurde der Ratte verabreicht. Nach 2 Stunden wurden die Tiere getötet und deren Gewebe entfernt, gewogen und hinsichtlich der Radioaktivität ausgezählt. Der Gesamtprozentanteil der Dosis im Knochen wurde berechnet, indem angenommen wurde, dass die Knochenprobe (Femur) 1/25stel des Gesamtgewichtes des Skelettsystems repräsentiert und, dass die Verteilung einheitlich ist. Die Gesamtblutdosis wurde berechnet, indem angenommen wurde, dass das Blut 6,5% des gesamten Körpergewichtes ausmacht. Die gesamte Muskeldosis wurde berechnet, indem angenommen wurde, dass die Muskeln 43% des gesamten Körpergewichtes ausmachen.

Bioverteilung von ^{153}Sm -PCTMP und ^{153}Sm -BP2P

Gewebe oder Organ	PCTMP	BP2P
Knochen	34,87	60,08
Leber	0,99	3,71
Niere	1,42	1,21
Milz	0,07	0,05
Muskel	4,77	1,53
Blut	6,27	0,87
Herz	n/a	0,07
Lunge	n/a	0,17
Gehirn	n/a	0,01
Magen	n/a	0,2
Dünndarm	n/a	0,39
Dickdarm	n/a	0,13

n/a bedeutet nicht erhältlich, da nichts detektiert wurde

[0089] Für die Analyse der Knochenfluoreszenz wurden 2 Ratten mit Tb-PCTMP oder Tb-BP2P initiiert. Nach 2 Stunden Equilibrierung wurden die Tiere getötet und die Femuren wurden entfernt.

[0090] Für die Fluoreszenzmessungen wurde das Instrument aus **Fig. 5** modifiziert. Die externe Beleuchtung wurde aus einer UV-Quelle (Härtungslampe), bestückt mit einem 270 nm Bandfilter durch eine flexible Flüssiglichtleitung auf die Probe gerichtet. Ein 550 nm Bandfilter wurde zwischen das Mikroskopobjektiv (3) und den CCD (5) gesetzt, um die Fluoreszenz zu selektieren und das Hintergrundlicht zu blockieren. Die gesammelten Darstellungen wurden in ein TIFF-Format konvertiert und wurden bearbeitet. Mehrere Linienpaare von verschiedenen Frequenzen wurden ausgetestet und deren Modulationswerte wurden als eine Funktion der Linienfrequenz aufgetragen. Die AIM-Plots für die drei Endoskope, die getestet wurden, wiesen darauf hin, dass

die grenzwertige Auflösung ungefähr gleich war für die 3 Skope. Die Auflösung ist abhängig von dem Modus oder dem Verfahren, das verwendet wird, um die Darstellung anzuzeigen oder sichtbar zu machen.

[0091] Aufgrund einer visuellen Untersuchung des hochauflösenden Videomonitors (7) kann eine Auflösung von 181 LP/mm erhalten werden. Die Auflösung dieser Größenordnung erlaubt es, Objekte aufzulösen, die 2,76 µm voneinander entfernt liegen. Solch eine Vergrößerung würde die Analyse von subzellulären Organellen, wie z. B. einem Nukleus (5–6 µm) oder dem endoplasmatischen Retikulum (3 µm) erlauben. Nach einer Erniedrigung der elektronischen Genauigkeit wurde eine Auflösung von 112 LP/mm erhalten, welches einer Auflösungskraft von 4,46 µm entspricht. Das Fluoreszenzbild und die Falschfarbendarstellung aus **Fig. 8** zeigt diese Fähigkeit. Weißlicht entsprechende Bilder sind in **Fig. 9** dargestellt. Kalibrierungskurven, die denen aus Beispiel II entsprechen, wurden verwendet, um die Menge an gelöstem Tb-PCTMP, das in einem dargestellten Bereich des Knochens (Oberfläche) vorliegt, abzuschätzen. Ein optisches Testen bei ungefähr 6 µm, wenn die Anregung bei ungefähr 270 nm und die Emission bei ungefähr 550 nm ist, stellt eine Fluoreszenzfluenz von ungefähr 66% her. Wenn sie in gleicher Weise wie in Beispiel II berechnet wird, ist es möglich, die Quantität an gelöstem Stoff innerhalb einer bestimmten, dargestellten Zone zu bestimmen. Beim Durchtesten der gesamten Region liegt ein kalkulierter Wert von ungefähr 5,19 Pikomolen an gelöstem Stoff vor.

Beispiel IV

[0092] Dieses System kann große gewebemorphologische Unterschiede auf Basis der Bindungscharakteristika des Chelates zeigen. Es ist bekannt, dass die physiologischen Bedingungen von normalem und neoplastischem Gewebe drastisch variieren [siehe R. K. Jain und G. R. Martin, *Cancer Res.* 54, 5670 (1994)]. Somit sind die vorliegenden Chelate mit dem beschriebenen System in der Lage, diagnostische Techniken in vivo bildlich darzustellen und zu unterstützen.

[0093] Tumore wurden in Sprague-Dawley-Ratten durch Injektion eines 1,2-Dimethylhydrazindichydrochlorid und das anschließende Füttern einer Hochfett-Diät auf Fleischbasis induziert. Probanden, die potentielle Kolonabnormalitäten enthielten, wurden durch Verwendung eines dreischrittigen Prozesses identifiziert. i) Ratten, die einen Gewichtsverlust und Fütterungsschwierigkeiten aufwiesen, wurden als potentielle Kandidaten beiseite genommen. ii) Diese Tiere wurden hinsichtlich Anzeichen von rektalem Bluten oder geschwärtzten Fäkalpellets inspiziert, was häufig ein Hinweis auf ein signifikant abnormales Wachstum ist. iii) Letztlich wurde unter Verwendung eines 2,5 mm Durchmesser dicken, 3 Meter langen flexiblen Mikroendoskops der Dickdarm von verschiedenen Tieren unter weißlichtendoskopischer Visualisierung inspiziert, um das Vorliegen einer abnormalen Gewebemasse zu bestätigen. Ein Tier mit einer beobachtbaren Läsion wurde anästhesiert, was ihm erlaubte während der Lavageeinführung des fluoreszierenden Markers zu atmen. Eine wässrige Lösung von Tb-PTCMB bei einer Konzentration von 0,1 mmol/kg Tierkörpergewicht wurde einer Sprague-Dawley-Ratte unter Verwendung des 1,0 mm Arbeitslumens des Mikroendoskops verabreicht. Die Einführung der Markerlösung wurde an dem Ort der erwarteten Gewebemasse gemacht, mit einem Volumen, das notwendig ist, um den gesamten Dickdarm auszufüllen (Verfahren beschrieben in U.S.-Patent 5,456,245). Man ließ sich die Markerlösung in dem Dickdarm für 20 Minuten ansiedeln, bevor die Ratte getötet und geöffnet wurde.

[0094] Aufgrund der Öffnung des Dickdarms wurde eine große einschließende Masse ungefähr 4,5 cm bis 5,0 cm gefunden, ungefähr 15 cm von Rektum entfernt. Es wurde normales Gewebe von dem Darm ungefähr 10 cm entfernt von der fraglichen Masse gesammelt. Gewebeproben aus der Masse und von dem normalen Bereich des Darms wurden dann in Saline gegeben und unmittelbar für die weitere histologische Präparation transportiert. Vier gefrorene Abschnitte wurden von allen Proben präpariert. Vier Projektträger von jeder Geweberegion wurden zunächst ungefärbt gelassen für die Fluoreszenzmikroskopdarstellung, die unten beschrieben ist und dann mit Hämatoxylin und Eosin (H&E-Färbung) gefärbt. Unter Verwendung von standardhistologischen Kriterien für die Diagnose wurden Gewebe, die aus der fraglichen Stelle genommen worden waren, als Adenokarzinoma bestimmt [Siehe S. S. Sternberg Herausgeber, "Histology of the Colon" in *Histology for Pathologists* (Raven Press, 1992); W. M. Copenhagen et al., "Histology of the Intestine" in *Bailey's Textbook of Histology* (The Williams & Wilkins Co. Baltimore, MA, 17te Ausgabe 1978), Kapitel 16, Seiten 495–509; K. M. Pozhariski, "Tumors of the Intestines", In *Pathology of tumors in Laboratory Animals*, E. V. Turosov Herausgeber (IARC, Lyon) 1, 119–140 (1973)]. Das Gewebe, das aus einer Stelle genommen war, die von der Abnormalität entfernt lag, wurde als normal bestimmt. Mikroskopische Bilddarstellungen der fraglichen Bereiche, die unter Verwendung der H&E-Methode gefärbt wurde, sind in den **Abb. 10A** und **11A** gezeigt.

[0095] Unter Verwendung eines intern modifizierten Mikroskops wurden Proben von den fraglichen und den davon entfernt liegenden Bereichen des Tieres bildlich dargestellt. Die Weißlichtreflektionsbilder aus dem fraglichen Bereich und die aus den davon entfernt liegenden Kolonabschnitten sind in den **Fig. 10B** und **11B** gezeigt. In den **Fig. 10C** und **11C** sind die Fluoreszenzdarstellungen der identischen Regionen derselben Gewebe gezeigt. Wie oben diskutiert, wurden diese Bereiche nacheinander mit H&E für die histologische Betrachtung gefärbt. Falschfarbentouren in dem Fluoreszenzbild entsprechen der Emissionsintensität und stellen die relative Menge an Marker dar, die in dem Gewebe eingetreten ist. Ein signifikanter Unterschied in der Auf-

nahme des gelösten Stoffes wird durch den großen Unterschied bei der Fluoreszenzintensität für das normale gegenüber dem neoplastischen Gewebe angezeigt. Die Chelataufnahme wird durch das Fluoreszenzsignal, das in dem normalen Gewebe (**Fig. 10C**) nachgewiesen wurde, dargestellt. Noch, basierend auf der Signalintensität, wird der relative Unterschied zwischen der Menge an gelöstem Marker, der in den Geweben gefunden wird, als eine Größenordnung eingeschätzt. Obwohl kein absolut schlüssiger Beweis, ist der beobachtete Unterschied im Fluoreszenzsignal signifikant genug, um eine bevorzugte oder verstärkte Aufnahme von Tb-PCTMB durch abnormales Kolongewebe nahezu legen. Solch ein signifikanter relativer Unterschied würde eine Verstärkung des Kontrastes bei Tumoren des Kolons und somit eine verbesserte Detektion erlauben. Da diese bevorzugte Markeraufnahme während einer niedrigkonzentrierten, wässrigen Lavage durch ein endoskopisches Arbeitslumen erfolgt, könnte es möglich sein, solche eine Technik für eine Kontrastverstärkung während der Koloskopie anzuwenden, unter Verwendung eines Sigmoidoskops, welches für die Fluoreszenzdarstellung modifiziert ist.

Beispiel V

[0096] HT-29-Zelllinien wurden von der American Type Culture Collection (ATCC) erhalten und in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 10% fötalem Kälberserum geführt. 3 Tage vor dem Zusammentreten der Zellen zu einer geschlossenen Schicht wurden die Zellen mit 2 ml von 2 mM Tb-PCTMB angeimpft und wurden bis zum Zusammenschluss der Zellen wachsen gelassen. 2 Tage vor dem Zusammenschluss der Zellen wurde das nichtgebundene Tb-PCTMB durch viermaliges Waschen mit PBS entfernt und die Zellen wurden von der Flasche mit 3 ml Trypsin abgenommen. Die Zellsuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen mit 12 ml Wachstumsmedium überführt und bei 1.000 g für 10 Minuten zentrifugiert, um die Zellen zu pelletieren. Die Medien und das Trypsin wurden entfernt und die Zellsuspension wurde in 5 ml mit Medium resuspendiert. Für die Erleichterung beim Zählen wurden 100 µl der Zellsuspension mit 100 µl des Mediums in einem Mikrofugenröhrchen gemischt. 50 µl dieser Lösung wurde dann mit 50 µl Trypan-Brau-Färbemittel gemischt und in ein Hämocytometer eingegeben. Die Zellen in 5 Quadraten auf dem Hämocytometer wurden ausgezählt, wobei gefärbte Zellen tot waren und ungefärbte Zellen lebten. Die Multiplikation der durchschnittlichen Anzahl je Quadrat um den Verdünnungsfaktor (4) gab die Anzahl an Zellen $\times 10^4$ pro ml. Die Anzahl der wiedergegebenen Zellen ist der Durchschnitt von 3 einzelnen Zählungen.

Cytotoxizitätsergebnisse von HT-29 Zellen

Kontrolle	Tb-PCTMB angeimpft
Gesamtzellpopulation*: $5,30 \times 10^6$	Gesamt (Zellen/ml)*: $4,70 \times 10^6$
Lebende Zellen: 94,3 %	Lebende Zellen: 91,5 %
Tote Zellen : 5,7 %	Tote Zellen : 8,5 %

* Mittel aus 3facher Zählung

[0097] Die Zählung für die Daten in den oben angegebenen Tabellen wurde als $\log K = 19$ durch M. P. Hubbard und D. J. Bornhop 1995 bestimmt. Die Werte sind gut vergleichbar mit ähnlichen Verbindungen, wie sie durch W. P. Cahceris et al., Inorg. Chem. 26, 958–960 (1987) und S. Aime et al., J. Chem. Soc., Chem. Commun. 1885–1886 (1966) gefunden wurden. Die Carboxylatanaloga der vorliegenden Chelate aus Formel I zeigen eine thermodynamische Stabilitätskonstante von $\log K = 19,5$.

[0098] UMR106-Zellen wurden aus der American Type Culture Collection erhalten und in Basal Eagle Medium mit 10% fötalem Kälberserum geführt. Die Zellen wurden so behandelt, dass 3×10^7 -Zellen in 25 ml Medium enthalten waren. Ein Tag vor dem Zusammentreten der Zellen wurden die Zellen mit 2 ml von 2×10^{-3} M Tb-PCTMP angeimpft. Beim Zusammentreten der Zellen wurden die Medien und Tb-PCTMP durch viermaliges Waschen mit PBS entfernt. Die Zellen wurden von der Flasche mit 3 ml Trypsin entfernt, in ein Zentrifugenröhrchen mit 12 ml Medium überführt und bei 1.000 g für 10 Minuten zentrifugiert, um die Zellen zu pelletieren. Das Pellet wurde in 2 ml des Mediums resuspendiert und durch Eintauchen des Röhrchens in flüssigen Stickstoff gefroren. Die gefrorene Mischung wurde aus der Tube herausgeschaufelt und in eine Reibschale überführt. Zu der Mischung wurde ein äquivalentes Gewicht an Seesand und 10 ml flüssiger Stickstoff zugegeben. Diese Mischung wurde mit einem Pistill 30 Minuten bis zur Verflüssigung gerieben. Die sich ergebende Mischung wurde in ein Zentrifugenröhrchen transferiert und bei 10.000 rpm 15 Minuten zentrifugiert, was intakte Zellen, Sand und Membranen in dem Pellet zurückließ und die cytoplasmischen Organellen im Überstand. Der Überstand wurde bei 5.000 rpm 90 Minuten in einem Ultrazentrifugenröhrchen zentrifugiert, um die Organellen zu pelletieren. Die Membran-, Zellen- und Sandmischung wurde durch einen Schichtfilter gefiltert,

um den Sand zu entfernen und durch einen 10 µm-Filter, um die intakten Zellen zu entfernen. [Diese differenzielle Zentrifugation wird durch H. Pertoft und T. C. Laurent in *Methods of Cell Separations*, N. Castimpoas, Herausgeber (C. Plenum Press, NY, 1te Ausgabe 1977) Kapitel 7 beschrieben.] Sowohl die Membranen wie auch die Organellen wurden auf Mikroskopobjektträger geschmiert und unter Verwendung eines Zeissmikroskopes, das für die UV-Anregung modifiziert war, analysiert. Der Organellenschmier aus den Kontrollobjektträgern zeigte keine wahrnehmbare Fluoreszenz, während in dem Schmier von dosierten Zellen eine signifikante Fluoreszenz detektiert wurde. Es wurde kein Signal in dem Membranschmier, sowohl der Kontroll- wie auch der dosierten Zellen detektiert.

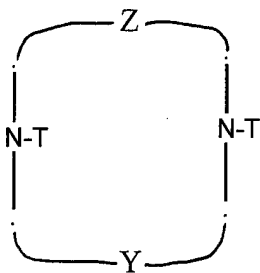
Cytotoxizitätsergebnisse von IEC-6 Zellen

Kontrolle	Tb-PCTMB angeimpft
Gesamtzellen*: $5,70 \times 10^6$	Gesamtzellen*: $5,30 \times 10^6$
Lebende Zellen: 89,5 %	Lebende Zellen: 90,6 %
Tote Zellen : 10,5 %	Tote Zellen : 9,4 %

* Durchschnitt einer 3fachen Zählung, Verfahren detailliert in Ref. 27

Patentansprüche

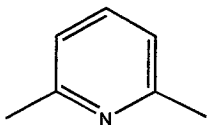
1. Ein fluoreszierender Komplex von tri- und tetra-cyclopoliazamacrocyclischen Verbindungen der Formel



(I),

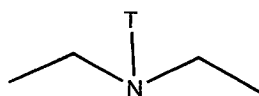
worin

Z



(E)

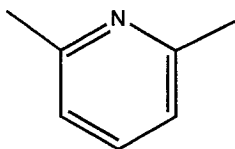
oder



(F)

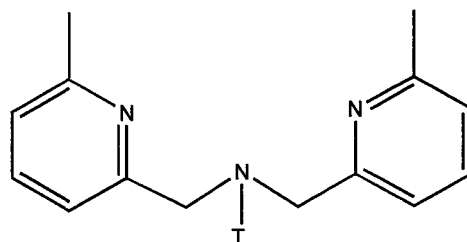
ist

Y



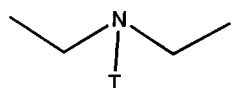
(A)

oder



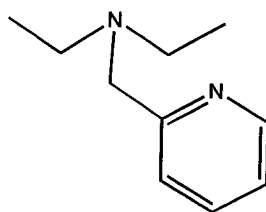
(B)

oder



(C)

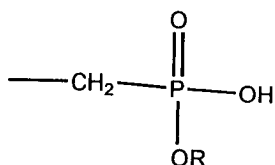
oder



(D)

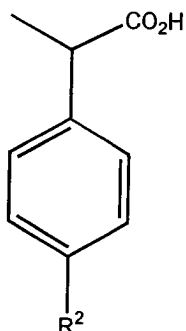
ist,

T



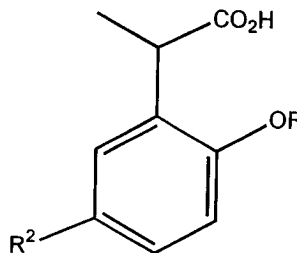
(G)

;



(H)

oder



(J)

ist,

wobei R gleich H, C₁-C₄-Alkyl oder -CH₂CF₃ ist;

R² eine NO₂-, NH₂-, Isothiocyanat-, Semicarbazid-, Thiosemicarbazid-, Maleimid-, Bromacetamid- oder Carboxylgruppe ist;

unter der Voraussetzung, dass Z nur (F) ist, wenn (D) anwesend ist und Z nur (E) ist, wenn (A), (B) oder (C) anwesend ist;

unter der Voraussetzung, dass, wenn T gleich (H) oder (J) ist, dann nur ein (H) oder (J) vorliegen soll;

in Komplex mit einem Metallion von Terbium (Tb), Europium (Eu) oder Dysprosium (Dy); oder

ein pharmazeutisch annehmbares Salz davon.

2. Ein Komplex, wie er in Anspruch 1 beansprucht ist, wobei das Metallion Tb oder Eu ist.
3. Ein Komplex, wie er in Anspruch 1 beansprucht ist, wobei Y gleich (A) ist.
4. Ein Komplex, wie er in Anspruch 1 beansprucht ist, wobei Y gleich (B) ist.
5. Ein Komplex, wie er in Anspruch 1 beansprucht ist, wobei Y gleich (C) ist.
6. Ein Komplex, wie er in Anspruch 1 beansprucht ist, wobei Y gleich (D) ist.
7. Terbium-3,6,9-tris(methylenphosphonsäure)-3,6,9,15-tetraazabicyclo[9.3.1]pentadeca-1(13),11,13-trien.
8. Terbium-N,N'-bis(methylenphosphonsäure)-2,11,diaza[3,3]-(2,6)pyridinophan.
9. Europium-3,6,9-tris(methylenphosphonsäure-n-butylester)-3,6,9,15-tetraazabicyclo[9.3.1]pentadeca-1(15),11,13-trien.
10. Terbium-3,6,9-tris(methylenphosphonsäure-n-butylester)-3,6,9,15-tetraazabicyclo[9.3.1]pentadeca-1(15),11,13-trien.
11. Eine pharmazeutische Formulierung, enthaltend einen Komplex, wie er in einem der vorstehenden Ansprüche beansprucht ist, und einen pharmazeutisch annehmbaren Träger.

12. Eine Formulierung, wie sie in Anspruch 11 beansprucht ist, in Form einer injizierbaren Lösung oder einer Waschlösung.

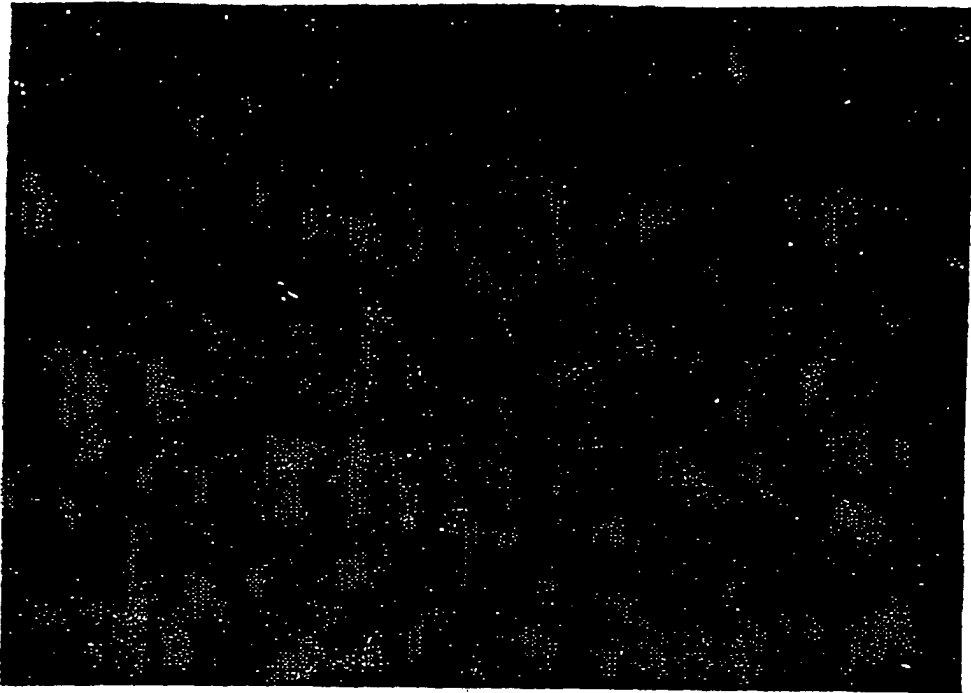
13. Ein Verfahren für den In-vitro-Immuno-Assay oder die DNA-Hybridisierung einer Gewebeprobe, welches umfasst, dass die Probe auf ein Medium gebracht wird, eine effektive Menge des Komplexes aus einem der Ansprüche 1 bis 10 zugegeben wird, wobei ein T gleich (H) oder (J) ist, und die Ergebnisse abgelesen werden.

14. Ein Verfahren zur Herstellung eines Komplexes der Formel (I), wie in einem der Ansprüche 1 bis 10 beansprucht, welches die Reaktion der Verbindung mit dem Metallionenhalogen in einer wässrigen Lösung umfasst.

15. Die Verwendung eines Komplexes, wie er in einem der Ansprüche 1 bis 10 beansprucht ist, für die Herstellung einer Formulierung zur Verwendung in der diagnostischen Behandlung eines Tieres.

Es folgen 13 Blatt Zeichnungen

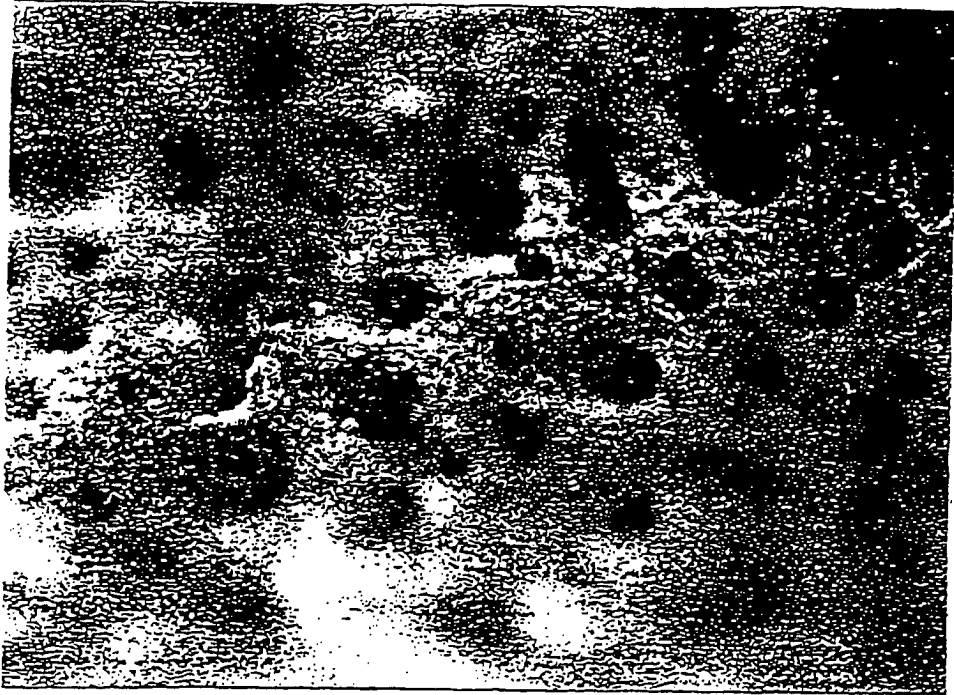
Anhängende Zeichnungen



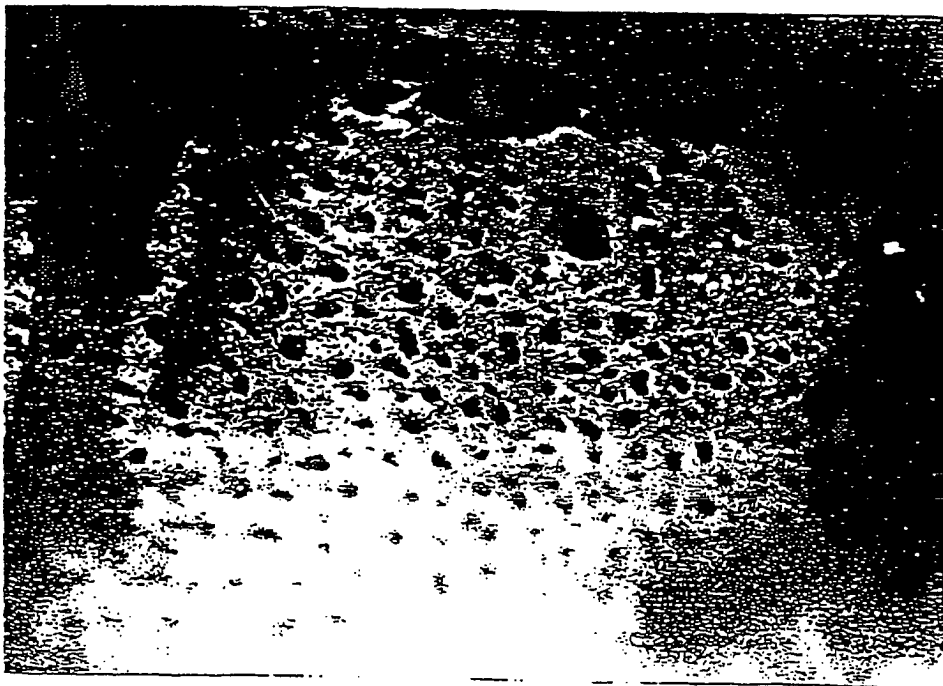
FIGUR 1



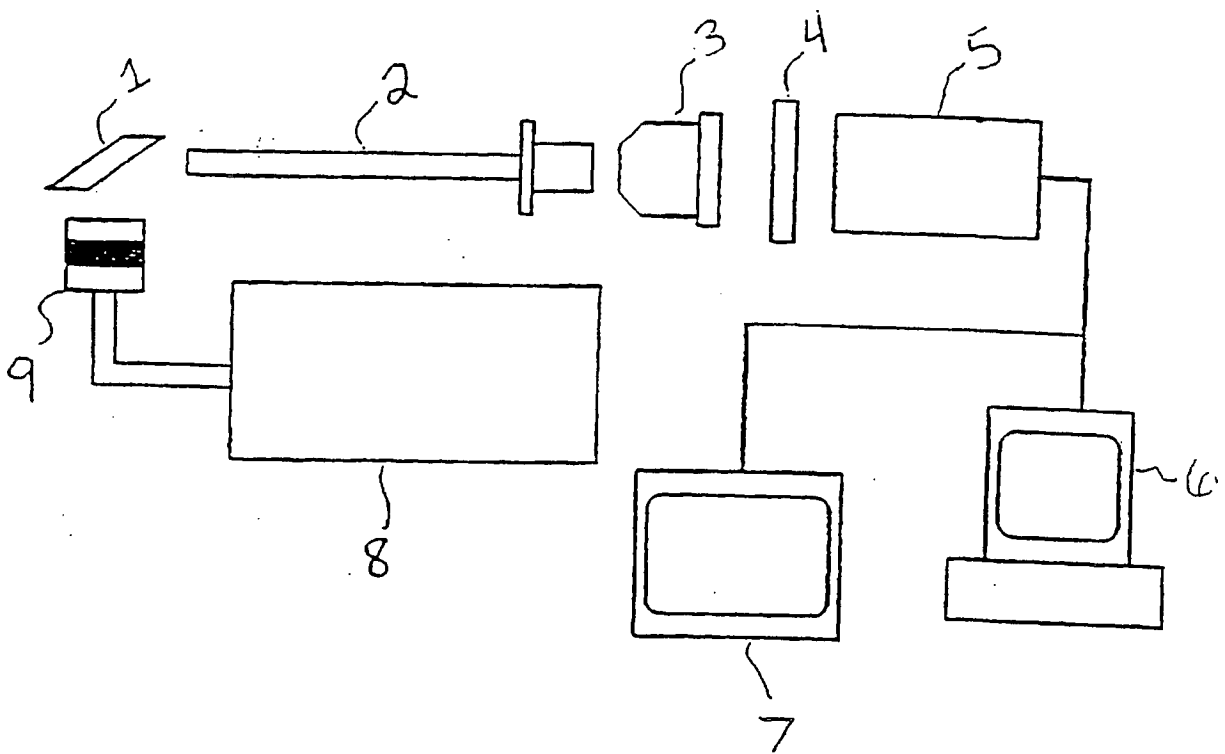
FIGUR 2



FIGUR 3

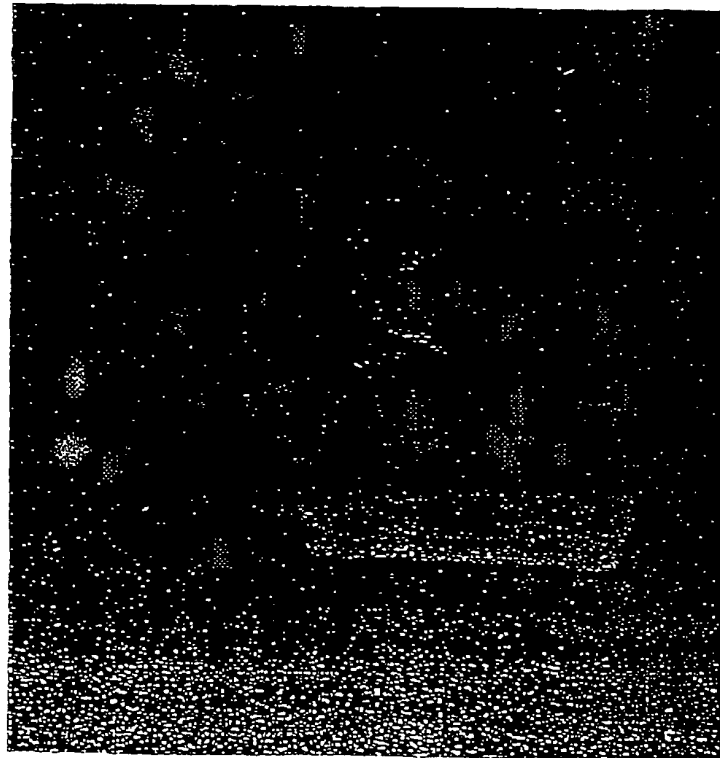


FIGUR 4

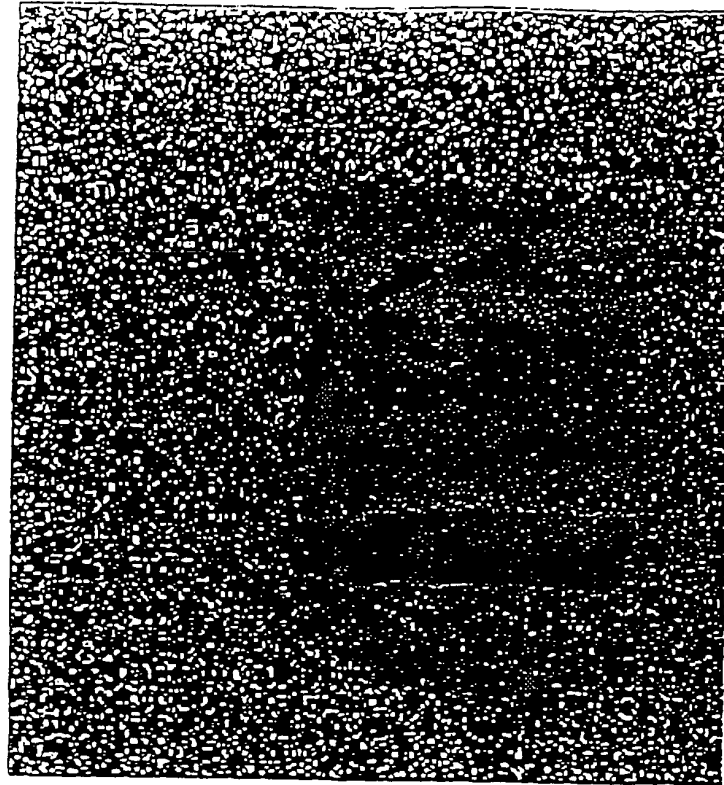


Figur. 5

Fluoreszenzdarstellungen des Ratten-Dünndarms (inneres Lumen)



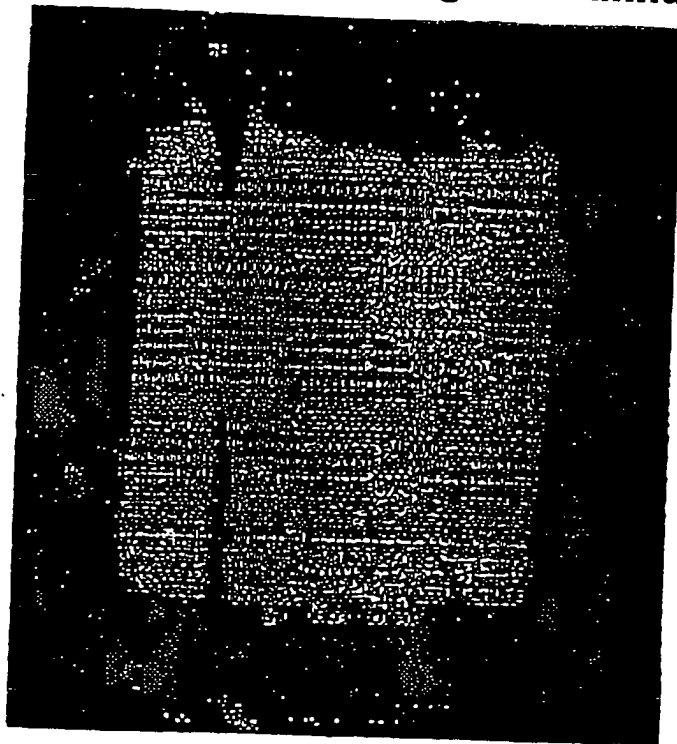
Aktuelle Darstellung



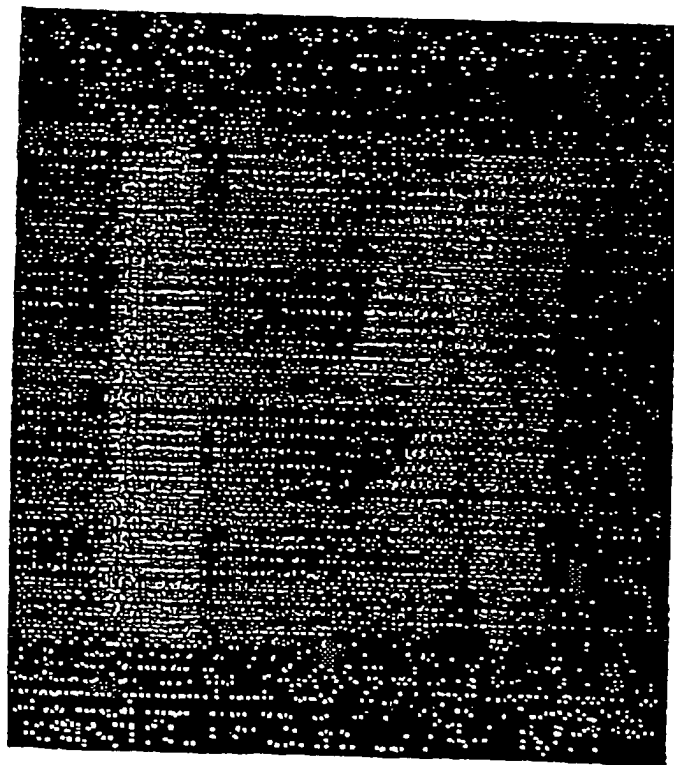
Falschfarben-Konturplot

Figur 6

Weißlichtdarstellung des Dünndarms

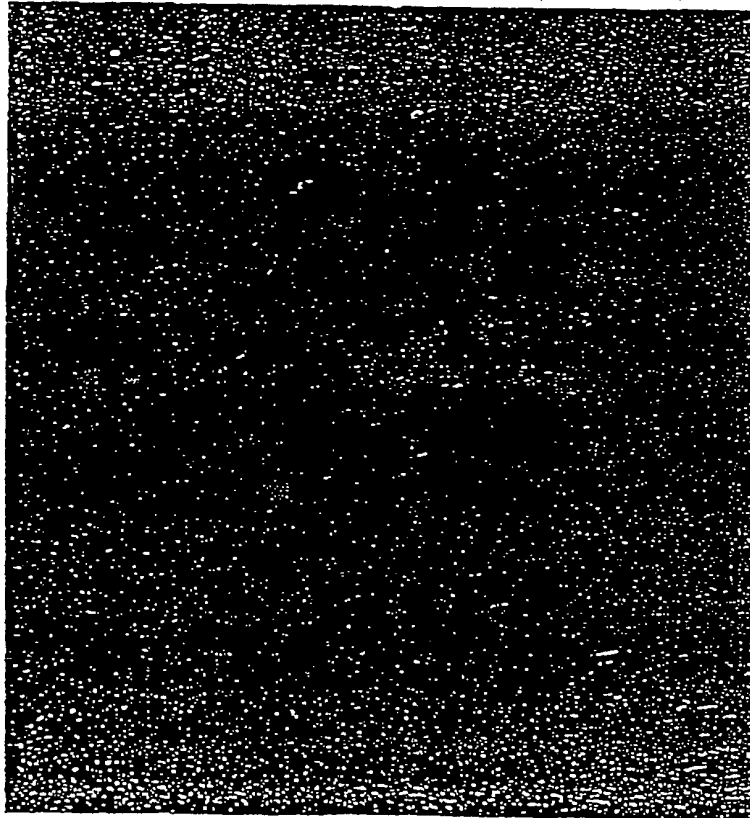


Fluoreszenzdarstellung des Dünndarms

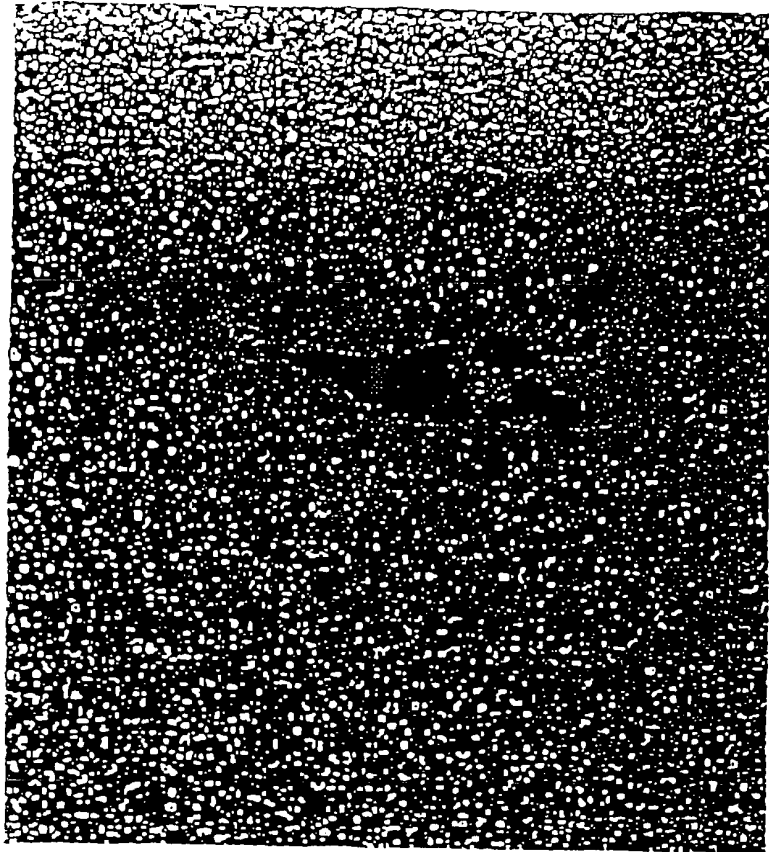


Figur 7

Fluoreszenzdarstellungen von proximalem Femur aus Ratte



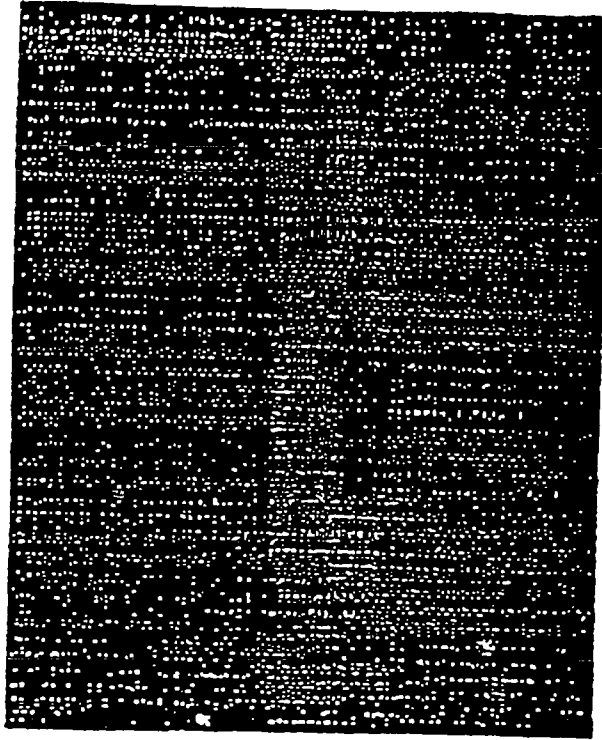
Aktuelle Darstellung



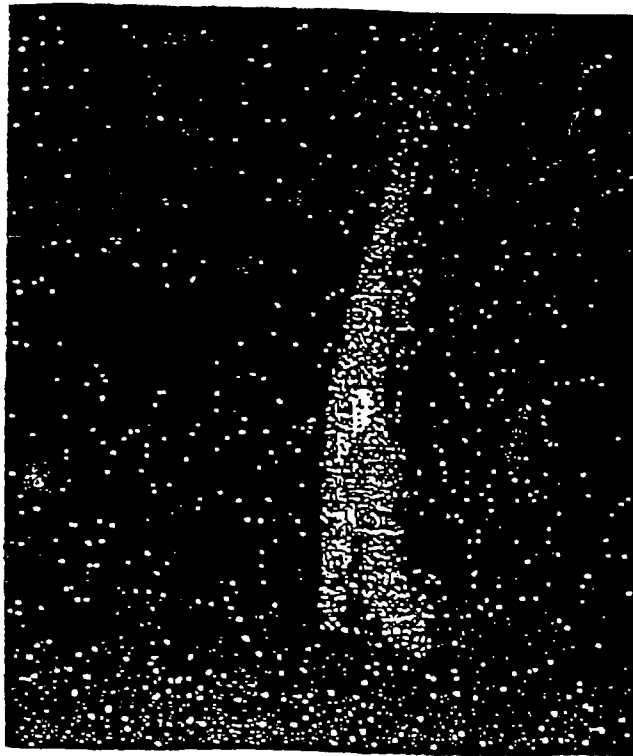
Falschfarben-Konturplot

Figur 8

Weißlichtdarstellung des Femurs



Fluoreszenzdarstellung des Femurs

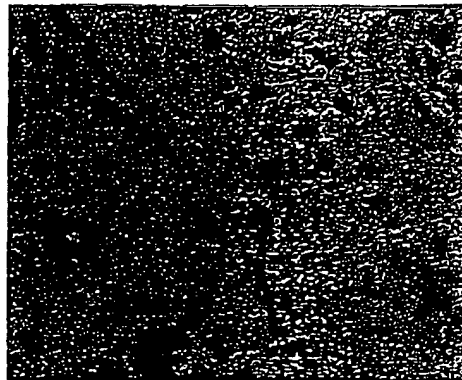


Figur 9

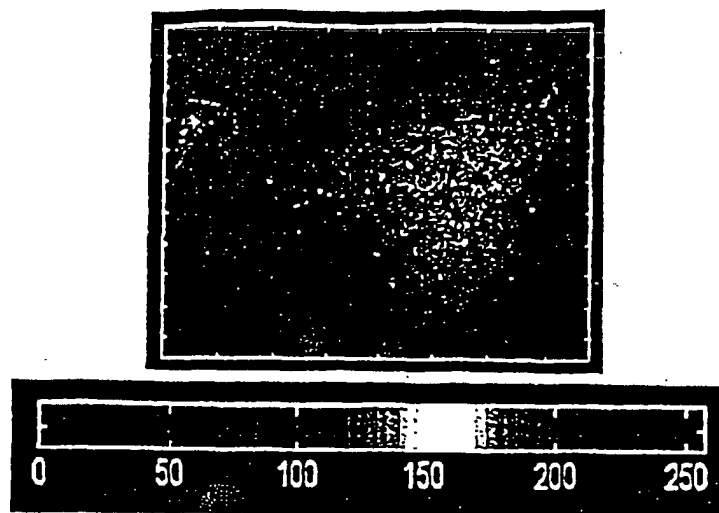
Figur 10A



Figur 10B



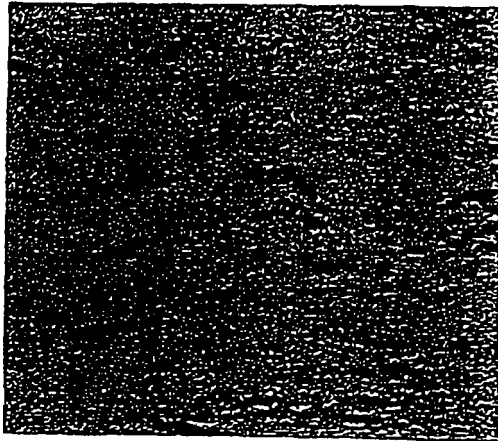
Figur 10C



Figur 11A



Figure 11B



Figur II C

