

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
24. August 2006 (24.08.2006)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2006/087144 A2

(51) Internationale Patentklassifikation:
A61K 49/18 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2006/001199

(22) Internationales Anmeldedatum:
6. Februar 2006 (06.02.2006)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2005 007 223.2
15. Februar 2005 (15.02.2005) DE

(71) Anmelder: SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT
[DE/DE]; Müllerstrasse 178, 13353 Berlin (DE).

(72) Erfinder: DINSE, Klaus-peter; Am Zapfenberg 1,
69121 Heidelberg (DE). HIRSCH, Andreas; Schloss-
weg 37, 91080 Rathsberg (DE). WEIDINGER, Alois;
Stubenrauchstrasse 63, 12161 Berlin (DE). HARNEIT,
Wolfgang; Harlingeroder Weg 8, 10589 Berlin (DE).
ROHRER, Martin; Viktoriastrasse 13, 12203 Berlin
(DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV,
LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG,
SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,
TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,
NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu ver-
öffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: CONTRAST AGENTS FOR NUCLEAR SPIN TOMOGRAPHY CARRIED OUT BY MEANS OF OVERHAUSER
EFFECT

(54) Bezeichnung: KONTRASTMITTEL FÜR DIE KERNSPINTOMOGRAPHIE UNTER NUTZUNG DES OVERHAUSER-
EFFEKTS

(57) Abstract: The invention relates to contrast agents for a nuclear spin tomography (magnetic resonance tomography TRM)
carried out by means of the Overhauser effect for transferring electron spin magnetic orientation to adjacent spin electrons.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Kontrastmittel für die Kernspintomographie (oder auch Magnetresonanztomo-
graphie, MRT) unter Nutzung des Overhauser-Effekts, die geeignet sind, die magnetische Ausrichtung von Elektronen-Spins auf
benachbarte Protonen-Spins zu übertragen.



WO 2006/087144 A2

Kontrastmittel für die Kernspintomographie unter Nutzung des Overhauser-Effekts

Die Erfindung betrifft Kontrastmittel für die Kernspintomographie (oder auch
5 Magnetresonanztomographie, MRT) unter Nutzung des Overhauser-Effekts, die
geeignet sind, die magnetische Ausrichtung von Elektronen-Spins auf benachbarte
Protonen-Spins zu übertragen.

Stand der Technik

10

Die Kernspintomographie ist ein bildgebendes Verfahren, das die magnetische
Ausrichtung von Protonen-Spins in einem von Außen angelegten Magnetfeld ausnutzt.
Die MRT hat sich in den letzten zwei Jahrzehnten zu einem etablierten und weit
verbreiteten Verfahren in der medizinischen Diagnostik entwickelt. Im Gegensatz zu
15 anderen Verfahren mit vergleichbarer diagnostischer Bedeutung – insbesondere der
Computertomographie (CT) – entsteht bei der MRT keinerlei Strahlenbelastung oder
sonstige bisher bekannte physiologische Belastung für den Patienten. Bei MRT werden
die Protonen-Spins der Wasserstoffkerne des Gewebewassers (oder des Blutes,
Lymphsystems etc.) durch ein äußeres starkes Magnetfeld ausgerichtet. Auf Grund der
20 geringen Polarisierbarkeit der Protonen-Spins, die von der Stärke des angelegten
statischen Magnetfelds abhängt, haben sich MRT Geräte mit Magnetfeldern unter 0.2 T
nicht in der klinischen Routine verbreitet. Die verbreitetste Feldstärke beträgt heute 1.5
T. Durch Anlegen zeitlich gepulster magnetischer Wechselfelder, deren Trägerfrequenz
der Resonanzfrequenz der Protonen-Spins bei der jeweiligen Feldstärke entspricht
25 (etwa 62 MHz bei 1.5 T), wird eine Detektion der Protonen-Spins u.a. nach Kernspin-
Relaxationszeit, Dichte und Bewegung ermöglicht, woraus Schlussfolgerungen auf Art
und Zustand von biologischem Gewebe möglich sind. Durch zusätzlichen Einsatz von
Magnetfeldgradienten in verschiedenen Richtungen lässt sich eine gute räumliche
Auflösung in Schichtbildern oder dreidimensionalen Darstellungen erzeugen.

30

Die Signalintensität und damit die Bildqualität werden insbesondere bestimmt durch die
Magnetfeldstärke, die bei einer für derartige Geräte sinnvollen Größe zwischen 0.5 und
3 T liegt.

Der der Magnetresonanz der Protonenspins analoge Prozess für Elektronenspins wird als Elektronenspin Resonanz (Electron Paramagnetic Resonance EPR) bezeichnet. Dieser Effekt ist bisher nicht zur Bildgebung in der medizinischen Diagnostik ausgenutzt worden. Beim Overhauser-Effekt findet ein Polarisationstransfer zwischen
5 verschiedenen Spinsystemen statt. Sofern diese Übertragung zwischen Elektronenspins und Protonenspins erfolgt, ist der Effekt für die Bildgebung nutzbar. Dies ist u.a. in [i], [ii], [iii] und [iv] beschrieben. Hierbei erfolgt eine Verstärkung der magnetischen Resonanz durch einen Polarisationstransfer von Elektronenspins auf die sie umgebenden bildgebenden Kerne. Dieser Effekt beruht darauf, dass sich
10 Elektronen-Spins leichter magnetisch ausrichten lassen als Protonen-Spins und ein Polarisationsübertrag auf benachbarte Protonen-Spins erfolgen kann. Dies wird auch mit Dynamischer Kernspinpolarisation (Dynamic Nuclear Polarisation – DNP) vom Overhauser-Typ bezeichnet. Die so ausgerichteten Protonen-Spins lassen sich nun mit den üblichen bildgebenden Verfahren, wie MRT erfassen und auswerten. Bei der
15 Anwendung in einem bildgebenden Verfahren führt dies zu einem verstärkten MRT-Signal. Während bei einer gewöhnlichen Kernspintomographie Magnetfelder von über 1T üblich sind, werden bei einer mittels Overhauser-Effekt verstärkten Magnet Resonanz Tomographie, im weiteren als OMRI (Overhauser-enhanced Magnetic Resonance Imaging) bezeichnet, Felder von nur 10 mT verwandt. Die um den Faktor
20 100 reduzierte Magnetfeldstärke gegenüber der konventionellen MRT ist erforderlich, um Anregungsfelder für die Elektronenspins zu erzeugen, die trotz des Skineffekts in tiefere Gewebeschichten einzudringen vermögen. Bei einem Magnetfeld von 1 T haben die Elektronenspins eine Resonanzfrequenz von $\sim 10^{10}$ Hz. Ein derartiges Anregungsfeld würde aber aufgrund des Skin-Effekts bereits an der Oberfläche absorbiert und dabei zu einer gefährlichen Erwärmung des Gewebes führen. Die
25 erforderliche Reduzierung des Magnetfeldes entspricht zufällig der durch den Overhauser-Effekt bewirkten Verstärkung, die ungefähr beim Faktor 100 liegt. Man gelangt daher zu Niedrigfeldsystemen, die eine ähnlich gute Bildauflösung aufweisen wie die in der Kernspintomographie üblichen, jedoch unter erheblicher Reduzierung apparativer Ausrüstungen, da auf supraleitende Magnete verzichtet werden kann. Dies
30 führt zu einer kostengünstigeren Untersuchungsmethode. Das untersuchte Gewebe ist zudem bei klinischer Anwendung wesentlich geringeren magnetischen Feldern ausgesetzt und die Untersuchungen können mit Geräten vorgenommen werden, die einen freien Zugang zum Probanden ermöglichen, d. h. es können auch Patienten mit

Klaustrophobie problemlos behandelt werden. Außerdem wird eine geringere Geräuschbelastung im Vergleich zur herkömmlichen MRT erreicht.

Bei der Kernspintomographie unter Nutzung des Overhauser-Effekts (OMRI-Verfahren)
5 muss eine (paramagnetische) Substanz zugeführt werden, deren Elektronenspins durch ein angelegtes äußeres Magnetfeld magnetisch ausgerichtet werden, und die geeignet ist, die magnetische Ausrichtung der Elektronen-Spins auf benachbarte Protonen-Spins zu übertragen. Bei den Substanzen, die bislang für OMRI entwickelt wurden, handelt es sich um paramagnetische Radikale. Es wurde bisher jedoch noch
10 keine Substanz weder einer systematischen, zulassungs-relevanten toxikologischen Untersuchung unterzogen noch in eine erste oder spätere Phase einer vorklinischen Studie oder klinischen Entwicklung gebracht (es gibt kein für OMRI zugelassenes Kontrastmittel).

15

In der EP 0 515 458 sind Substanzen beschrieben, bei der freie Kohlenstoffradikale vom Triarylmethyl-Typ (Trityl) verwendet werden, um ein Kontrastmedium für die Kernspintomographie unter Nutzung des Overhauser-Effekts herzustellen. EP 0 832 054 beschreibt ähnliche Methylradikale, die durch heterocyclische Aromaten
20 substituiert sind für den gleichen Zweck.

Eine andere Substanzklasse als Kontrastmittel für die Kernspintomographie unter Nutzung des Overhauser-Effekts ist in der EP 0 625 055 B1 beschrieben, wonach Kohlenstoffallotrope und andere analoge netzartige molekulare Strukturen als
25 grundlegende strukturelle Bestandteile verwendet werden.

In der WO 01/24696 wird als Kontrastmittel für OMRI ein Fullerol angegeben, das mindestens ein freies Elektron aufweist. Diese Verbindung weist eine geringe Stabilität auf, weshalb nur während einer relativ kurzen Zeitdauer ein Polarisationsübertrag
30 stattfinden kann.

In Bezug auf ihre Eignung als OMRI Kontrastmittel sind in der Literatur der letzten Jahre am ausführlichsten beschrieben die o.g., unterschiedlich substituierten Triarylmethyl und Triphenylmethyl Radikale (siehe z.B. US 5,289,125; US 4,984,573; und EP 0 515 458).
35

Die Eigenschaften dieser, beispielsweise in [i], [ii], [iii], [v], [vi] beschriebenen Trityle werden daher im Folgenden als aktueller "Stand der Technik" weiter beschrieben.

- 5 Die genannten Substanzen ermöglichen teilweise zufriedenstellende in-vitro Ergebnisse [ii], die bisherigen in-vivo Experimente an Tiermodellen zeigen jedoch ein zu geringes praktisch erreichbares Overhauser-enhancement, um für eine klinische Weiterentwicklung als OMRI-Substanz für allgemeine diagnostische Bildgebung in Frage zu kommen. Hierfür sind Dosierungen in der Größenordnung zwischen
10 1mMol/kg Körpergewicht und 5mMol/kg Körpergewicht notwendig [v], für die eine klinische Entwicklung und Zulassung aus toxikologischen und kommerziellen Gesichtspunkten nicht aussichtsreich ist. Standard-Dosierungen konventioneller Kontrastmittel für die MRT liegen bei max. 0.1mMol/kg Körpergewicht, zunehmend jedoch im $\mu\text{mol/kg}$ – Bereich. Zusätzlich zeigt sich bei den Kohlenstoff-Radikalen eine
15 starke Degradierung des Overhauser-enhancement in Plasma und in Blut (gegenüber wässrigen Lösungen), was auf reversible Proteinbindungen der Substanzen in Blut und den Einflüssen von Sauerstoff auf den Overhauser-Effekt zurückzuführen ist [ii]. In deoxygeniertem Wasser wird die Stabilität unterschiedlicher Trityle mit Halbwertszeiten zwischen einigen Stunden und bis zu einem Jahr angegeben [ii], [iii]. Generell weisen
20 diese Radikale durch die freien Elektronen eine hohe chemische Reaktivität auf, die zu einer unerwünschten Toxizität und zum Verlust des Effekts führen kann.

Das erzielbare Overhauser-enhancement (bei einer gegebenen eingestrahnten Radiofrequenzleistung für die Elektronenspinübergänge) hängt unter anderem von den
25 Relaxationszeiten des Elektronenspins ab.

Dabei sind lange Spin-Gitter- (T_{1e}) und Spin-Spin Relaxationszeiten (T_{2e}) des Elektronenspins für OMRI-Kontrastmittel vorteilhaft, um einen möglichst hohen Polarisationsübertrag während der EPR-Anregung zu erzielen. Die Trityle sind eine in dieser Hinsicht relativ günstige Substanzklasse, für die Werte in der Größenordnung
30 von $T_{1e} \approx T_{2e} \approx 8 \mu\text{s}$ (extrapoliert auf "unendliche" Verdünnung) bestimmt wurden (aus [ii] Tabelle 3, S. 8, in isotoner NaCl-Lösung bei 37° C: "Perdeuteriertes Trityl": $T_{1e} \approx 13 \mu\text{s}$, $T_{2e} \approx 8 \mu\text{s}$; "Deuteriertes Hydroxy Trityl": $T_{1e} \approx 11 \mu\text{s}$, $T_{2e} \approx 8 \mu\text{s}$, "Symmetrisches Trityl": $T_{1e} \approx 9 \mu\text{s}$, $T_{2e} \approx 9 \mu\text{s}$). Analog zu den vergleichsweise langen elektronischen Relaxationszeiten werden schmale EPR-Resonanzlinien dieser Substanzklasse in
35 flüssigen Lösungen beobachtet. In [ii] werden EPR-Linienbreiten $< 1 \mu\text{T}$ in wässriger

Lösung, wiederum bezogen auf unendliche Verdünnung, und in [i] eine inhomogen verbreiterte EPR-Linienbreite von 6 μT , angegeben. Sowohl die EPR-Linienbreiten als auch ursächlich die elektronischen Relaxationszeiten sind stark abhängig von den jeweiligen Umgebungsbedingungen. Hierzu gehören insbesondere die vorliegende
5 Konzentration des Kontrastmittels als auch von in der Umgebung gelöstem Sauerstoff. Die Relaxationszeiten des Elektronenspins und die EPR-Linienbreiten des Moleküls werden durch intramolekulare Hyperfeinstrukturen und eine große Verteilung der elektronischen Spindichte über das Molekül negativ beeinflusst. Vorteilhaft bei den Tritylen ist dabei, dass sie aufgrund der fehlenden Hyperfeinstruktur des ungepaarten
10 Elektrons mit dem zentralen Kohlenstoffatom (Kernspin von ^{12}C : $I = 0$) nur eine singuläre, dominierende EPR Linie aufweisen. Außerdem wurde mit den vorgeschlagenen Substanzen eine zentrale Lokalisation der Spindichte über eine symmetrische Molekülstruktur sowie eine Verringerung der weiteren intramolekularen Wechselwirkungen durch Deuterierung (Substitution von Wasserstoffkernen durch das
15 Wasserstoff-Isotop ^2H) angestrebt. Dies gelang bei den bekannten Ansätzen jedoch nur bedingt und, wie die Ergebnisse nahe legen, in nicht ausreichender Form.

Ein weiterer Parameter, der für die Eignung des Kontrastmittels sowohl für OMRI als auch für konventionelle MRT von entscheidender Bedeutung ist, stellt die Protonen-
20 Relaxivität dar, mit der die Verkürzung der Relaxationszeiten von umgebenden Protonenspins in Anwesenheit des Kontrastmittels beschrieben wird. Dabei sind möglichst *kurze* Kernspinrelaxationszeiten der das OMRI-Kontrastmittel umgebenden Protonen für einen großen OMRI-Effekt von Vorteil. Daraus resultiert die Forderung nach großen Werten für die Protonen Relaxivität des OMRI Kontrastmittels. In der
25 zitierten Literatur [i], [ii], [iii] werden für die Trityl-Derivate Relaxivitäts-Werte zwischen 0,14 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ und 0,44 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ angegeben.

Beschreibung der Erfindung

30 Die Aufgabe der Erfindung besteht darin, paramagnetische Substanzen bereitzustellen, bei denen mit möglichst geringer Energie viele Elektronen-Spins angeregt werden, und die geeignet sind, diese magnetische Ausrichtung mittels Polarisationstransfer auf möglichst viele Kern-Spins zu übertragen. Sie sollen lange Relaxationszeiten des Elektronenspins und daraus folgend sehr schmale und exakt begrenzte EPR-
35 Linienbreiten aufweisen.

Zusätzlich besteht für die Eignung als OMRI-Kontrastmittel die Forderung einer möglichst effizienten Verkürzung von Kernspin-Relaxationszeiten der umgebenden Protonen. Dies wird durch eine möglichst hohe Protonen-Relaxivität dargestellt.

- 5 Darüber hinaus müssen sie wasserlöslich, stabil und toxisch unbedenklich sein, damit sie als Kontrastmittel für OMRI zu Gewebeuntersuchungen an lebenden Organismen verwendet werden können.

10 Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe dadurch gelöst, dass wasserlösliche paramagnetische Substanzen als Kontrastmittel für die Kernspintomographie unter Ausnutzung des Overhausereffekts (OMRI) verwendet werden, die endohedrale Fullerene enthalten, die dadurch gekennzeichnet sind, dass sie mit atomarem Stickstoff (N) oder mit atomarem Phosphor (P) gefüllt sind, vorzugsweise sind sie gefüllt mit ^{14}N , ^{15}N , und ^{31}P . Die endhoderalen Fullerene werden entweder durch kovalente
15 Modifikation wasserlöslich gemacht. Sie können jedoch auch durch nicht-kovalente Modifikation wasserlöslich gemacht werden.

20 Diese Zusammensetzungen und Substanzen sind als Kontrastmittel für die Kernspintomographie unter Ausnutzung des Overhausereffekts (OMRI) geeignet und können als solche verwendet werden.

Der Molekülkäfig der erfindungsgemäßen Fullerene besteht aus ≥ 60 Kohlenstoffatomen und besteht vorzugsweise aus bis zu 82 Kohlenstoffatomen, bevorzugt besteht er aus 60 Kohlenstoffatomen.

25

Damit die erfindungsgemäßen endohedralen Fullerene als Kontrastmittel für OMRI zu Gewebeuntersuchungen an lebenden Organismen verwendet werden können, müssen diese wasserlöslich gemacht werden.

30

Die Solubilisierung der endohedralen Fullerene erfolgt in einer bevorzugten Ausführungsform derart, dass an die Fullerene funktionelle chemische Gruppen kovalent angebunden werden, die eine hohe Wasserlöslichkeit vermitteln. Besonders bevorzugt wird die Funktionalisierung mithilfe von Malonsäureestern, die analog

Literatur erfolgen kann [vii, viii, ix]. Diese Ester werden anschließend verseift [x]. Die entstehenden Carbonsäuresalze sind sehr gut wasserlöslich.

Die Vorteile dieser Verbindungen liegen in ihrer hohen Stabilität und geringen Toxizität.

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft in einer weiteren Ausführungsform Substanzen bestehend aus endohedralen Fullerenen der Formel $(Z@C_x)-R_n$,
wobei
R eine hydrophile Gruppe bedeutet,
n für eine Ziffer zwischen 1-10 steht, und
- 10 X eine Ziffer zwischen 60 und 82 ist,
sowie deren physiologisch verträgliche Salze,
dadurch gekennzeichnet dass
Z Stickstoff oder Phosphor bedeutet,
- 15 In einer bevorzugten Ausführungsform ist sind die erfindungsgemäßen endohedralen Fullerene dadurch gekennzeichnet, dass
R eine $C(COY)_2$ Gruppe bedeutet, die mit dem Fulleren über zwei benachbarte C-Atome verbunden ist und somit einen Cyclopropanring bildet und Y unabhängig voneinander NR^1R^2 oder OR^1 bedeutet,
- 20 wobei R^1 und R^2 unabhängig voneinander H, oder C_1-C_{10} -Alkyl,
welches mit 1 bis 6 Hydroxylgruppen substituiert ist,
bedeuten, und
n für eine Ziffer 1-10 steht,
sowie deren physiologisch verträgliche Salze.
- 25 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist sind die erfindungsgemäßen endohedralen Fullerene dadurch gekennzeichnet, dass
R eine $C(COY)_2$ Gruppe bedeutet, die mit dem Fulleren über zwei benachbarte C-Atome verbunden ist und somit einen Cyclopropanring bildet,
- 30 Y OR^3 bedeutet und
n gleich 1 ist,
wobei
R³ ein bis zu 50 C-Atome umfassender dendrimärer verzweigter Alkylrest ist, der von bis zu 10 N- oder O-Atomen oder $-C(O)N(H)-$ Resten unterbrochen sein kann und
- 35 der mit bis zu 10 Hydroxy-, Carbonsäure-, oder Carbonsäureamid-Gruppen substituiert sein kann,

sowie deren physiologisch verträgliche Salze.

Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen wasserlöslichen endohedralen Fullerenen, dadurch
5 gekennzeichnet, dass hydrophile funktionelle Gruppen kovalent an ein endohedrales Fulleren ($Z@C_x$) gekoppelt werden, wobei Z und x wie oben definiert sind.

Hydrophile Fullerene wurden bereits in US 2003/0220518 beschrieben. US 2003/0220518 offenbart jedoch nur in generischer Weise dass andere Atome in den
10 endohedralen Fullerenen enthalten sein können, wie beispielsweise „NMR active atoms (e.g. ^3He , ^{31}P , ^{13}C , ^{15}N , ^{11}B , ^{19}F)“. Es ist jedoch aus der Auswahl der spezifischen Isotope und der Eigenschaft „NMR active atoms“ offensichtlich, dass solche endohedralen Fullerene nur zur Detektion mit konventioneller MRI vorgeschlagen werden, wofür Atome mit einem Kernspin $\geq \frac{1}{2}$ benötigt werden. Insbesondere mit der
15 expliziten Nennung des Isotops ^{13}C , das im Unterschied zum häufigsten natürlich vorkommenden Kohlenstoff Isotop ^{12}C die genannte Voraussetzung erfüllt, wird dieser Aspekt belegt, denn für die Verwendung als OMRI Kontrastmittel ist das Vorhandensein eines Kernspins $\geq \frac{1}{2}$ bei dem Atom, dem ein oder mehrere ungepaarte Elektronen zugeordnet werden, in keiner Weise notwendig, wie beispielsweise in US
20 5,530,140 für OMRI Substanzen offenbart: die dort genannten Kohlenstoffradikale (Triarylmethyl Radikale) sind nicht an die Verwendung des „NMR aktiven“ ^{13}C Isotops gebunden. Gleichmaßen zeigt sich dieser Aspekt in der Nennung des Stickstoff Isotops ^{15}N in US 2003/0220518 und der Auslassung des von ^{14}N , welches in der vorliegenden Erfindung als Einschlusselement einbezogen ist.

25 In der Kernspintomographie unter Ausnutzung des Overhausereffekts (OMRI) geht es jedoch entscheidend um das Vorliegen von ungepaarten Elektronen und insbesondere den spezifischen Eigenschaften des damit einhergehenden Elektronenspin.

Daher ist die erfindungsgemäße Verwendung von wasserlöslichen, paramagnetische Substanzen, die endohedrale Fullerene enthalten, die dadurch gekennzeichnet sind,
30 dass sie mit atomarem Stickstoff (N) oder mit atomarem Phosphor (P) gefüllt sind, als Kontrastmittel für die Kernspintomographie unter Ausnutzung des Overhausereffekts (OMRI) bislang nicht im Stand der Technik beschrieben worden oder nahe gelegt worden.

Weiterhin sind auch die erfindungsgemäßen Substanzen, die zum Einen durch die spezifischen kovalenten Modifikationen des Fullerenkäfigs gekennzeichnet sind und zum Anderen durch die spezifische Beladung des Käfigs mit atomarem Stickstoff oder Phosphor gekennzeichnet sind, durch die generische Offenbarung in US 2003/0220518
5 weder offenbart noch nahe gelegt.

In einer anderen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden wasserlösliche Kontrastmittel bereitgestellt indem die Solubilisierung dadurch erreicht wird, dass die nackten Fullerene als Gast in einem Gast-Wirts-Komplex verwendet werden, wobei das Wirtsmolekül in hohem Maße wasserlöslich ist. Zum Beispiel kann diese
10 Komplexierung mit Cyclodextrin analog [^{xi}] durchgeführt werden. Dabei entstehen in der Regel keine kovalenten Bindungen zwischen Gast- und Wirtsmolekül. Diese Variante hat den Vorteil, dass das angewendete Verfahren einfacher durchzuführen ist. Bei der Verwendung bekannter Wirtsmoleküle wie z. Beispiel der Cyclodextrine ist die toxikologische Unbedenklichkeit bereits bekannt. Geeignete Cyclodextrine sind alpha-,
15 beta- und gamma-Cyclodextrine und Derivate davon, beispielsweise Hydroxypropyl-Derivate. Besonders bevorzugte Cyclodextrine sind beta-Cyclodextrin und Hydroxypropyl-beta-Cyclodextrin. Weitere geeignete Gast-Wirts-Komplexe können unter Verwendung von Calix[n]arenen und Derivaten davon (Atwood J.L. et al., 1994, Nature, 368: 229-231; Bhattacharya et al., 2003, J. Phys. Chem. B., 107. 11830-
20 11834), insbesondere Calix[4]arenen, Calix[6]arenen und Calix[8]arenen und Derivaten davon als Wirtsmoleküle, hergestellt werden. Geeignete Derivate sind insbesondere Derivate die zum hydrophilen charakter der Wirtsmoleküle beitragen. Geeignete Calixaren-Derivate sind beispielsweise sulfonato-Calixarene (Yang W. und de Villiers, 2005, AAPS J., 7, Art. 23, E241-E248).

25 In einer anderen Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung also Kontrastmittel für die Kernspintomographie unter Ausnutzung des Overhausereffekts (OMRI) wobei
das Kontrastmittel ein Gast-Wirts-Komplex ist, und wobei
30 das Wirtsmolekül in hohem Maße wasserlöslich ist und
das Gastmolekül aus endohedralen Fullerenen der Formel (Z@Cx) besteht,
wobei Z Stickstoff oder Phosphor bedeutet, und
X eine Ziffer zwischen 60 und 82 ist.

Bevorzugt ist das Wirtsmolekül Cyclodextrin, insbesondere ein beta-Cyclodextrin oder ein Derivat davon.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist das Wirtsmolekül ein Calix[n]aren, insbesondere ein Calix[4]aren, Calix[6]aren oder Calix[8]aren oder ein Derivat davon.

Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung von wasserlöslichen paramagnetischen Substanzen die endohedrale Fullerene enthalten, die dadurch gekennzeichnet sind, dass sie mit atomarem Stickstoff (N) oder mit atomarem Phosphor (P) gefüllt sind, als Kontrastmittel für die Kernspintomographie unter Ausnutzung des Overhausereffekts (OMRI).

Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung von wasserlöslichen paramagnetischen Substanzen die endohedrale Fullerene enthalten, die dadurch gekennzeichnet sind, dass sie mit atomarem Stickstoff (N) oder mit atomarem Phosphor (P) gefüllt sind, zur Herstellung eines Kontrastmittel für die Kernspintomographie unter Ausnutzung des Overhausereffekts (OMRI).

Die Erfindung betrifft weiterhin wasserlösliche paramagnetischen Substanzen, die endohedrale Fullerene enthalten, die dadurch gekennzeichnet sind, dass die endohedralen Fullerene mit atomarem Stickstoff (N) oder mit atomarem Phosphor (P) gefüllt sind, zur Verwendung als Kontrastmittel für die Kernspintomographie unter Ausnutzung des Overhausereffekts (OMRI).

Die erfindungsgemäßen Verbindungen sind aufgrund ihrer Wasserlöslichkeit leicht intravenös applizierbar. Es besteht auch die Möglichkeit das Kontrastmittel direkt an definierten Orten zu deponieren um einen gezielten Polarisationsaustausch zu ermöglichen.

Die Vorteile der Erfindung bestehen gegenüber den bekannten Kontrastmitteln für OMRI unter anderem darin, dass diese endohedralen Fullerene inert sind, d. h. sie verhalten sich chemisch als auch elektrisch faktisch neutral. Die Einschlusselemente weisen eine stabile Hülle auf, so dass sich keine freien Elektronen an der Außenseite des Fulleren befinden. Daraus folgt, dass diese endohedralen Fullerene ausschließlich

über die magnetische Dipolwirkung auf ihre Umgebung wirken. Die Einschlusselemente sind im Gegensatz zu metallischen Einschlüssen, die an die Käfiginnenseite anlagern, frei in der Käfigmitte des Fulleren positioniert, wodurch keine Wechselwirkungen mit dem Fulleren-Molekül stattfinden. Diese symmetrische und nach außen abgeschlossene Struktur der endohedralen Fullerene bewirkt eine große Stabilität dieser Verbindung.

Die erfindungsgemäße Substanz $N@C_{63}(COOH)_6$ (III) besitzt lange Spin-Relaxationszeiten des ungepaarten Elektrons. Mit gepulsten Spin-Echo EPR-Messungen im X-Band (9.5 GHz EPR-Larmorfrequenz) und aus CW EPR Linienbreiten im L-Band (1.1 GHz EPR-Larmorfrequenz) konnten sehr lange elektronische Relaxationszeiten $T_{1e} \cong 150 \mu s$ und $T_{2e} \cong 22 \mu s$ in flüssiger Lösung gemessen werden (s. Figur 4), die mindestens eine Größenordnung länger sind als die der Trityle. Aus [ii] Tabelle 3, S. 8, in isotoner NaCl-Lösung bei 37° C: "Perdeuteriertes Trityl": $T_{1e} \cong 13 \mu s$, $T_{2e} \cong 8 \mu s$; "Deuteriertes Hydroxy Trityl": $T_{1e} \cong 11 \mu s$, $T_{2e} \cong 8 \mu s$, "Symmetrisches Trityl": $T_{1e} \cong 9 \mu s$, $T_{2e} \cong 9 \mu s$.

Die besondere Eignung der erfindungsgemäßen endohedralen Fullerene zeigt sich des Weiteren aufgrund ihrer gegenüber dem Stand der Technik überraschend hohen Relaxivität, die in standardisierter Weise mittels relaxometrischer Messungen bestimmt wird. Die Substanz (III) weist eine Relaxivität $r_1 \cong 47 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (gegenüber den Trityl-Derivaten mit Relaxivitäts-Werten zwischen $0,14 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und $0,44 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [i], [ii], [iii]) in wässriger Lösung mit einer Spinkonzentration von $6 \mu M$ bei einer Lösungsmitteltemperatur von 37°C auf. Dieser unerwartet hohe Wert liegt bei einer Magnetfeldstärke von ca. 15 mT vor, was einer Radiofrequenz von 600 kHz und damit den für OMRI notwendigen Bedingungen sehr niedriger Magnetfeldstärke entspricht.

Aufgrund der gegenüber dem Stand der Technik um mindestens einen Faktor 10 längeren Spinrelaxationszeiten der erfindungsgemäßen endohedralen Fullerene ist bei deren Verwendung als OMRI-Kontrastmittel eine wesentlich geringere RF-Leistung für die Anregung der EPR - Übergänge notwendig. Daher ist die gewünschte Verstärkung der MRT-Signale durch den Overhauser Effekt mit niedrigeren RF-Leistungen zur EPR-Anregung möglich.

Zusätzlich führt die gegenüber den Tritylen überraschenderweise festgestellte wesentlich höhere Protonen-Relaxivität der erfindungsgemäßen Substanzen zu einer weiteren, entscheidenden Steigerung des OMRI-Effekts: Aufgrund der gegenüber den Tritylen um mindestens ebenfalls eine Größenordnung gesteigerten Verkürzung der Relaxationszeiten der umgebenden Protonenspins ist es möglich, OMRI -
5 Untersuchungen mit entsprechend geringeren Kontrastmittel Dosierungen insbesondere im Bereich ab 0,05mMol/kg Körpergewicht bis 1mMol/kg Körpergewicht, in dem mit den Tritylen kein ausreichender OMRI-Effekt erzielt werden kann, durchzuführen.

10

Da die Sauerstoff-Empfindlichkeit von $N@C_{60}$ und deren Derivaten $(N@C_x)-R_n$ gering ist und die von $P@C_{60}$ und deren Derivaten $(P@C_x)-R_n$ erhöht ist, können durch gleichzeitige oder zeitlich versetzte Messungen mit diesen beiden Substanzen Tomographie-Bilder ohne und mit Sauerstoffnachweis (Oximetrie) zur Darstellung von
15 physiologischen oder pathologischen Zuständen erstellt werden, ähnlich wie es mit Tritylen experimentell unter Verwendung hoher Kontrastmittel-Dosierungen (1 bis 5 mmol/kg Körpergewicht) demonstriert wurde [v], [vi]. Mit EPR-Messungen von $P@C_{60}$ (IX) in Toluol kann eine reversible 20fache EPR-Linienverbreiterung nach Spülung der Lösung mit Sauerstoff beobachtet werden, die bei $N@C_{60}$ und Derivaten nicht auftritt
20 (siehe Figur 4).

Die Erfindung betrifft daher die Verwendung von den erfindungsgemäßen wasserlöslichen endohedralen Fulleren-Derivaten, dadurch gekennzeichnet, dass zuerst ein Kontrastmittel mit atomarem Stickstoff als Einschlusselement $(N@C_x)-R_n$ verwendet wird und eine erste Kernspintomographie durchgeführt wird und zeitlich
25 versetzt danach ein Kontrastmittel mit atomarem Phosphor als Einschlusselement $(P@C_x)-R_n$ verwendet wird und eine zweite Kernspintomographie durchgeführt wird.

30 Beispiele

Die Erfindung soll nachstehend an Hand von Ausführungsbeispielen näher erläutert werden. Die zugehörigen Zeichnungen stellen dar:

- Fig. 1a: Schematische Darstellung eines endohedralen Fulleren $N@C_{60}$ (I)
- Fig. 1b: Schematische Darstellung eines endohedralen Fulleren $P@C_{60}$ (IX)
- 5 Fig. 2: X-Band ESR Spektrum von $N@C_{60}$ (I) in CH_2Cl_2 bei 300 K
- Fig. 3: L-Band ESR Spektrum von $N@C_{63}(COOH)_6$ (III) in H_2O bei 300 K
- Fig. 4: Figur 4 zeigt die reversible Sauerstoffempfindlichkeit von $P@C_{60}$ in Toluol
- 10 Fig. 5: Schemazeichnung zur Synthese der e,e,e-Hexacarbonsäure (IV) nach Beispiel 1
- Fig. 6: Schemazeichnung zur Synthese der Malonsäurevorstufe nach Beispiel 2
- Fig. 7: Synthese des Dendrimers nach Beispiel 2
- 15 Fig. 8: Schemazeichnung zur Synthese des Dendrimer-Fullerens nach Beispiel 2

20

Die Herstellung der endohedralen Stickstoff-Fullerene $N@C_{60}$ (I) erfolgt beispielsweise durch Ionenimplantation. [xii]

Die anschließende Trennung der gefüllten von den leeren Fullerenen erfolgt durch High Performance Liquid Chromatography (HPLC) [xiii].

25

Alle folgenden Beispiele werden mit einem Gemisch aus $N@C_{60}$ und „leerem“ C_{60} durchgeführt. Für die EPR und OMRI-Messungen ist ein Spingehalt zwischen 10^{-2} und 10^{-4} ausreichend. In den folgend beschriebenen Beispielen ist der Spingehalt des Fullerengemisches 10^{-4} bis 10^{-2} .

30

Beispiel 1 Synthese von $N@C_{63}(COONa)_6$ (III)

Zunächst werden 255 mg (0.354 mmol / 1.0 equ.) $N@C_{60}$ (I) unter Argonschutz und Rühren in 400 ml trockenem Toluol gelöst. Anschließend gibt man 205 mg (0.319 mmol

35

/ 0.9 equ.) cyclo-[3]-Octylmalonat [^{xiv}] und 243 mg (0.956 mmol / 2.7 equ.) Iod hinzu. Daraufhin lässt man eine Lösung von 404 mg (397 µl / 2.65 mmol / 7.5 equ.) DBU in 160 ml trockenem Toluol über 3 h zutropfen, wobei die Farbe nach tieforange umschlägt. Nach weiteren 10 min Rühren bei Raumtemperatur wird das Rohgemisch
5 einer Flash Chromatographie auf Kieselgel (6 x 25 cm) unterworfen. Spuren nichtumgesetzten C₆₀ wird mit anderen Verunreinigungen zuerst mit Toluol als Laufmittel eluiert und anschließend mit Toluol/Ethylacetat (98:2) das gewünschte e,e,e-Trisaddukt (**II**) als orange Bande eluiert. Das e,e,e-(cyclo-[3]-Octylmalonyl)-hexahydro-[60]-fulleren (**II**) wird von dem in Spuren mitgebildeten trans-4,trans-4,trans-4-Isomer
10 mittels präparativer HPLC auf Nucleosil (Toluol/Ethylacetat 98:2) abgetrennt, die Fraktion im Vakuum eingedampft und das Produkt aus Dichlormethan/Pentan ausgefällt. Nach dreifachem Waschen mit Pentan und Trocknen im Hochvakuum bei 60 °C erhält man 174.0 mg (0.1282 mmol, 36.2%) orangerotes Pulver [e,e,e-(cyclo-[3]-Octylmalonyl)-hexahydro-[60]fulleren (**II**).

15

Die e,e,e-Trisaddukt-Hexacarbonsäure N@C₆₃(COOH)₆ (**IV**) erhält man durch 3 h Rühren einer Lösung von 100 mg des entsprechenden e,e,e-Trisadduktmalonats (**II**) in 50 ml Toluol unter Stickstoffschutz in Gegenwart eines 20fach molaren Überschusses von NaH bei 60 °C. Damit wird das NaH homogen im Toluol dispergiert. Nach Zugabe
20 von 1 ml Methanol fällt das Natriumsalz der e,e,e-Trisaddukt-Malonsäure (**III**) unter heftiger Gasentwicklung quantitativ als Niederschlag aus. Die flüssige Phase wird durch Zentrifugieren entfernt und der Niederschlag bei 12 h im Vakuum bei 60 °C getrocknet.

25 Die freie Säure (**IV**) kann durch Waschen des Natriumsalzes der e,e,e-Trisaddukt-Malonsäure (**III**) mit Toluol, 2 M Schwefelsäure und Wasser und anschließender Trocknung für 12 h im Vakuum bei 60° C erhalten werden.

Beispiel 2: Synthese des dendrimer-Fullerens (VIII)5 **4-Benzyloxybutansäure**

Zu einer Lösung aus (44.3 ml, 50 g, 0.58 mol) γ -Butyrolacton, und 276 ml (396.8 g, 2.32 mol) Benzylbromid in 600 ml Toluol werden 129.9 g (2.32 mol) fein gemörsertes 85 %iges Kaliumhydroxid unter Rühren zugegeben und unter Rückfluss mit einem Wasserabscheider für 48 Stunden erhitzt. Die erhaltene Suspension wird mit
10 600 ml Wasser und 300 ml Diethylether versetzt. Die wässrige Phase wird dreimal mit je 300 ml Diethylether extrahiert. Die gesammelten organischen Phasen werden eingeeengt und mit 50 g NaOH und 600 ml Wasser für weitere 20 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Die wässrige Phase wird mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert und anschließend dreimal mit je 300 ml CH_2Cl_2 extrahiert. Nach Trocknung der
15 organischen Phase über MgSO_4 und abdestillieren des Lösungsmittel, werden 24 g eines hellgelben Öls erhalten. Bei der über Nacht erhitzten Lösung werden die Phasen getrennt und die wässrige Phase dreimal mit je 150 ml Diethylether gewaschen. Anschließend wird die wässrige Phase mit 40 ml konz. H_2SO_4 in 200 ml Eis angesäuert und dreimal mit je 300 ml CH_2Cl_2 extrahiert. Die gesammelten organischen Phasen
20 werden über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel abgezogen. Man erhält ein dünnflüssiges hellgelbes Öl.

4-Benzyloxybutansäure-*t*-butylester

35 g (0.180 mol) 4-Benzyloxybutansäure und 20 ml CH_2Cl_2 werden in einem Autoklaven gefüllt und auf -70°C (Trockeneis/Aceton) abgekühlt. Anschließend werden
25 90 ml flüssiges Isobuten und 2 ml konz. H_2SO_4 als Katalysator zugegeben. Der Autoklav wird verschlossen und 72 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Ablassen des Drucks wird die bräunliche Lösung mit 50 ml CH_2Cl_2 verdünnt. Diese Lösung wird zuerst mit KHCO_3 -Lösung neutralisiert, dann mit Zitronensäure-Lösung und Wasser gewaschen. Die milchige trübe Lösung trocknet man über MgSO_4 . Nach
30 Abziehen des Lösungsmittels erhält man ein hellgelbes Öl.

Di-(4-*tert*-butoxy-4-oxobutyl)malonat

Diese Reaktion wird wasserfrei und in einer Stickstoffatmosphäre durchgeführt. 12.30 g (76.80 mmol) 4-Hydroxybuttersäure-*tert*-butylester und 6.08 g (76.80 mmol) trockenes

Pyridin werden in 250 ml absolutem Methylenchlorid gelöst und unter Rühren auf 0 °C gekühlt. Dann werden langsam 5.40 g (38.40 mmol), gelöst in 10 ml absolutem Methylenchlorid) Malonyldichlorid zugegeben. Man lässt zwei Stunden bei 0 °C und 12 h bei RT rühren. Anschließend filtriert man das Reaktionsgemisch über Kieselgel, wäscht mit Wasser und trocknet die organische Phase über MgSO₄. Das Lösungsmittel wird abgezogen, das Produkt durch FC (Cyclohexan:Ethylacetat 5:1) gereinigt. Man erhält 9.70 g einer gelben, öligen Flüssigkeit.

Di-(4-hydroxy-4-oxobutyl)malonat

10 Zu 1.57 g Di-(4-*tert*-butoxy-4-oxobutyl)malonat (4.04 mmol) gibt man 15 ml 98% Ameisensäure. Der Ester löst sich und ist nach zweitägigem Rühren bei Raumtemperatur vollständig entschützt. Nach Entfernen der Ameisensäure im Ölpumpenvakuum erhält man in quantitativer Ausbeute die Disäure.

15

4-Nitro-4-[2-*t*-(butoxycarbonyl)ethyl]-heptandisäurediester

Eine Lösung von 16.2 ml Nitromethan (18.3 g, 0.3 mol) und drei ml Triton B (40 % in Methanol) in 60 ml Dimethoxyethan wird unter Rühren auf 70 °C erhitzt. Anschließend werden 135 ml (119.2 g, 0.93 mol) Acrylsäure-*t*-butylester zugetropft, wobei die Temperatur konstant gehalten wird. Setzt im Anschluss eine Abkühlung ein, so werden nochmals insgesamt sechs ml Triton B innerhalb von fünf min zugegeben. Dann wird die Reaktionsmischung eine Stunde bei 70 °C gerührt, anschließend im Vakuum eingengt und in 600 ml CH₂Cl₂ aufgenommen. Die Lösung wird erst mit 10 %iger HCl, dann dreimal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und die organische Phase über MgSO₄ getrocknet. Nach Abziehen des Lösungsmittels wird der gelbliche Rückstand aus Ethanol umkristallisiert. Man erhält einen farblosen kristallinen Feststoff.

4-Amino-4-[2-*t*-(butoxycarbonyl)ethyl]-heptandisäurediester

Man löst 25 g (60 mmol) der Nitro-Verbindung erster Generation unter gelindem Erhitzen in 600 ml Ethanol und hydriert mit 25 g Raney-Nickel bei RT und Normaldruck. Die Reaktionskontrolle erfolgt mittels DC (SiO₂: Hexan/EtOAc 1:2). Nach 48 Stunden wird der Katalysator über Celite abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Den gelben, öligen Rückstand reinigt man säulenchromatographisch an Kieselgel (SiO₂: Hexan/EtOAc 2:1). Man erhält ein weißes Pulver.

4-Nitro-[2-(carboxyethyl)]heptandisäure

Man löst 15 g (45 mmol) NO₂[G-1] in 100 ml Ameisensäure und rührt 24 Stunden bei RT. Nach ca. 30 min beginnt ein weißer Niederschlag auszufallen. Die Ameisensäure wird im Vakuum abgezogen. Der weiße Feststoff wird anschließend dreimal mit Toluol versetzt, welches jeweils wieder abdestilliert wird. Nach dem Trocknen erhält man ein weißes Pulver.

9-Cascade:nitromethan[3]:(2-aza-3-oxypentylidyne):propionsäure-*tert*-butylester

Man löst 4.5 g (16 mmol) 4-Nitro-[2-(carboxyethyl)]heptandisäure, 22.3 g (53.5 mmol) 4-Amino-4-[2-*t*-(butoxycarbonyl)ethyl]-heptandisäurediester und 6.5 g (48 mmol) 1-Hydroxy-benzotriazol in 350 ml absolutem DMF und versetzt diese Lösung mit 9.92 g (48 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) gelöst in 50 ml absolutem DMF. Nach ca. einer Stunde beginnt sich ein weißer Niederschlag zu bilden. Die Reaktionskontrolle erfolgt mittels DC (SiO₂: Hexan /EtOAc: 2:1) Nach 60 Stunden wird von ausgefallenem DCU abfiltriert und das Lösungsmittel abdestilliert. Der gelbliche Rückstand wird in 500 ml Ethylacetat aufgenommen und nacheinander mit 10 %iger HCl, Wasser, 10 %iger NaHCO₃-Lösung und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (SiO₂: Hexan/EtOAc 2:1) erhält man ein weißes Pulver.

9-Cascade:aminomethan[3]:(2-aza-3-oxypentylidyne):propionsäure-*tert*-butylester

Man löst 9.0 g (6 mmol) der Nitro-Verbindung 2. Generation in 100 ml Ethanol und hydriert mit 5 g Raney-Nickel bei RT und Normaldruck. Nach 48 Stunden wird der Katalysator über Celite abfiltriert und das Lösungsmittel abgezogen. Der gelbliche Rückstand wird durch (SiO₂: Hexan/EtOAc 1:2) gereinigt und das Produkt schließlich mit MeOH von der Säule eluiert. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in CH₂Cl₂ gelöst und von unlöslichem Kieselgel abfiltriert. Nach abdestillieren des Lösungsmittels im Vakuum wird ein sich beim Trocknen aufschäumender weißer Feststoff erhalten.

18-Cascade: dihydromethan[2]:(2-aza-7-oxa-3,8-dioxooctylidyne):(2-aza-3-oxopentyl-idyne):propansäure-*tert*-butylester

- 5 Eine Lösung von 436 mg (1.580 mmol) Di-(4-hydroxy-4-oxobutyl)malonat, 716 mg (3.470 mmol) DCC, 550 mg (3.470 mmol) 1-HOBT und 5.00 g (3.47 mmol) Amin 2. Generation in DMF werden 48 h bei Raumtemperatur unter Feuchtigkeitsausschluss gerührt. Nach Abfiltrieren des ausgefallenen DCU und Entfernen des DMF im Vakuum wird der Rückstand in Ethylacetat aufgelöst und mit 10%-iger Zitronensäure, Wasser,
10 8%-iger NaHCO₃-Lösung und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Anschließend wird die organische Phase mit MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel abrotiert. Nach FC (Cyclohexan:Ethylacetat 1:1) erhält man einen weißen Feststoff.

18-Cascade:1,2-Methano-1,2-dihydro[60]fulleren[2]:(2-aza-7-oxa-3,8-

15 **dioxooctylidyne): (2-aza-3-oxopentylidyne):propansäure-*tert*-butylester**

- Eine Lösung von 439 mg (0.610 mmol) N@C₆₀, 102 mg (0.670 mmol) DBU, 202 mg (0.610 mmol) CBr₄ und 1.90 g (0.61 mmol) 18-Cascade: dihydromethan[2]:(2-aza-7-oxa-3,8-dioxooctylidyne):(2-aza-3-oxopentyl-idyne):propansäure-*tert*-butylester in 300 ml Toluol (mit N₂ gesättigt) lässt man einen Tag bei RT rühren. Die Reaktionsmischung
20 wird über eine Kieselgelsäule filtriert. Zuerst wird nicht umgesetztes N@C₆₀ mit Toluol eluiert, anschließend die Mischung aus Mono- und Bisaddukten mit Toluol:Ethylacetat 1:1 eluiert. Diese Mischung wird mit FC (Ether:Hexan 6:1) getrennt und man erhält einen braunen Feststoff.

25 **18-Cascade:1,2-Methano-1,2-dihydro[60]fulleren[2]:(2-aza-7-oxa-3,8-dioxooctylidyne): (2-aza-3-oxopentylidyne):propansäure 8**

Man löst und rührt 0.648 g (0.17 mmol) in 98%-iger Ameisensäure 24 h bei RT. Nach Entfernung der Ameisensäure im Vakuum erhält man ein rot-braunen Pulvers.

[ⁱ] [Golman K., Leunbach I., Ardenjaer-Larsen J.H., Ehnholm G.J., Wistrand L.G., Petersson J.S., Järvi A. and Vahasalo S., Overhauser-Enhanced MR Imaging (OMRI), *Acta Radiologica*, 39, pp.10-17 (1998)]

[ⁱⁱ] [Ardenkjaer-Larsen J.H., Laursen I., Leunbach I., Ehnholm G., Wistrand L.-G., Petersson J.S., Golman K., EPR and DNP Properties of Certain Novel Single Elektron Contrast Agents Intended for Oximetric Imaging, *JMR* 133, 1-12 (1998)]

[ⁱⁱⁱ] [Golman K., Petersson J.S., Ardenkjaer-Larsen J.H., Leunbach I., Wistrand L.G., Ehnholm G. and Liu Kecheng, Dynamic In Vivo Oxymetry Using Overhauser Enhanced MR Imaging, *J. Magn. Reson. Imag.*, 12, pp. 929-938 (2000)]

[iv] U. Katscher und S. Petersson, Kernspintomographie unter Nutzung des Overhausereffekts, *Phys. Bl.* 56, pp. 51-54 (2000)

[^v] [Krishna, M.C.; English, S.; Yamada, K.; Yoo, J.; Murugesan, R.; Devasahayam, N.; Cook, J. A.; Golman, K.; Ardenkjaer-Larsen, J. H.; Subramanian, S.; Mitchell, J.B., Overhauser enhanced magnetic resonance imaging for tumor oximetry: Coregistration of tumor anatomy and tissue oxygen concentration, *PNAS* 99, p. 2216-22, (2002)]

[^{vi}] [Krishna M.C., Subramanian S., Kuppusamy P. and Mitchell J.B., Magnetic resonance imaging for in vivo assessment of tissue oxygen concentration. *Semin Radiat Oncol*, 1, pp. 58-69 (2001)]

[^{vii}] X. Camps, A. Hirsch, *J.Chem.Soc.PerkinTrans.* 1997, 11, 1595-1596.

[^{viii}] I. Lamparth, H. Karfunkel, A. Hirsch, *Angew.Chem.* 1994, 106, 453-455.

[ix] I. Lamparth, H. Karfunkel, A. Hirsch, *Angew.Chem.Int.Ed.* 1994, 33, 437-438.

[x] I. Lamparth, A. Hirsch, *J.Chem.Soc.,Chem.Comm.* 1994, 14, 1727-1728

[^{xi}] [C. N. Murthy und K. E. Geckeler, *The water-soluble β -cyclodextrin-[60]fullerene complex*, in: *Chemical Communications*, Bd. 13 (2001) S. 1194-1195]

[^{xii}] A. Weidinger, T. Almeida Murphy, B. Mertesacker, M. Höhne, T. Pawlik, J.-M. Spaeth und B. Pietzak, Verfahren und Vorrichtung zur Herstellung von stabilen endohedralen Fullerenen der Struktur (Z@C_x) mit x $\geq$ 60, WO 98/00363

[^{xiii}] Goedde, B.; Waiblinger, M.; Dinse, K.-P.; Weidinger, A. Preparation of highly-enriched N@C₆₀/C₆₀ and N@C₇₀/C₇₀. *Proceedings - Electrochemical Society* (2001), 2001-11(Fullerenes--Volume 11: Fullerenes for the New Millennium), 304-312.

[^{xiv}] U. Reuther., T. Brandmuller, et al., *Chem.Eur.J.* 2002, 8(10), 2261-2273.

Patentansprüche

1. Kontrastmittel für die Kernspintomographie unter Ausnutzung des
Overhausereffekts (OMRI)
5 wobei,
das Kontrastmittel aus endohedralen Fullerenen ($Z@C_x$)- R_n besteht,
R eine hydrophile Gruppe bedeutet,
n für eine Ziffer zwischen 1-10 steht, und
X eine Ziffer zwischen 60 und 82 ist,
10 sowie deren physiologisch verträgliche Salze,
dadurch gekennzeichnet, dass Z Stickstoff oder Phosphor bedeutet.
2. Kontrastmittel nach Anspruch 1,
15 dadurch gekennzeichnet, dass
R eine $C(COY)_2$ Gruppe bedeutet, die mit dem Fulleren über zwei benachbarte C-
Atome verbunden ist und somit einen Cyclopropanring bildet und Y unabhängig
voneinander NR^1R^2 oder OR^1 bedeutet,
wobei R^1 und R^2 unabhängig voneinander H, oder C_1 - C_{10} -Alkyl, welches mit bis
20 zu 6 Hydroxylgruppen substituiert ist, bedeuten und n für eine Ziffer 1-10 steht,
sowie deren physiologisch verträgliche Salze.
3. Kontrastmittel nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet, dass
25 R eine $C(COY)_2$ Gruppe bedeutet, die mit dem Fulleren über zwei
benachbarte C-Atome verbunden ist und somit einen Cyclopropanring bildet,
Y OR^3 bedeutet und

n gleich 1 ist,

wobei

R^3 ein bis zu 50 C-Atome umfassender dendrimerer verzweigter Alkylrest ist, der von bis zu 10 N- oder O-Atomen oder $-C(O)N(H)-$ Resten unterbrochen sein kann und der mit bis zu 10 Hydroxy-, Carbonsäure-, oder Carbonsäureamid-Gruppen substituiert sein kann, sowie deren physiologisch verträgliche Salze.

4. Kontrastmittel für die Kernspintomographie unter Ausnutzung des Overhausereffekts (OMRI)
- wobei
- das Kontrastmittel ein Gast-Wirts-Komplex ist, und wobei
- das Wirtsmolekül in hohem Maße wasserlöslich ist und
- das Gastmolekül aus endohedralen Fullerenen der Formel $(Z@C_x)$ besteht,
- X eine Ziffer zwischen 60 und 82 ist,
- dadurch gekennzeichnet dass
- Z Stickstoff oder Phosphor bedeutet.

20

5. Verfahren zur Herstellung der Verbindungen gem. Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass
- hydrophile funktionelle Gruppen kovalent an ein endohedrales Fulleren $(Z@C_x)$ gekoppelt werden, wobei Z und x wie in Anspruch 1 definiert sind.

25

- 6.. Verwendung von Kontrastmitteln nach den Ansprüchen 1 bis 3 zur Durchführung von Oximetrie-Messungen,

dadurch gekennzeichnet, dass

zuerst ein Kontrastmittel mit atomarem Stickstoff als Einschlusselement
(N@C_x)-R_n

5 verwendet wird und eine erste Kernspintomographie durchgeführt wird und zeitlich

versetzt

10 danach ein Kontrastmittel mit atomarem Phosphor als Einschlusselement
(P@C_x)-R_n

verwendet wird und eine zweite Kernspintomographie durchgeführt wird.

15 7. Verwendung von wasserlöslichen paramagnetischen Substanzen, die endohedrale Fullerene enthalten, zur Herstellung eines Kontrastmittel für die Kernspintomographie unter Ausnutzung des Overhausereffekts (OMRI)

dadurch gekennzeichnet sind, dass die endohedralen Fullerene mit atomarem Stickstoff (N) oder mit atomarem Phosphor (P) gefüllt sind.

20

8. Verwendung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet dass die endohedralen Fullerene mit atomarem ¹⁴N, ¹⁵N, oder ³¹P gefüllt sind.

9. Verwendung nach einem der Ansprüche 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, dass

25 Substanzen nach einem der Ansprüche 1 bis 4 verwendet werden.

10. Wasserlösliche paramagnetischen Substanzen, die endohedrale Fullerene enthalten,

dadurch gekennzeichnet sind, dass die endohedralen Fullerene mit atomarem

30 Stickstoff (N) oder mit atomarem Phosphor (P) gefüllt sind, zur Verwendung als

Kontrastmittel für die Kernspintomographie unter Ausnutzung des Overhausereffekts (OMRI)