

# PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

**2002 -343**

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **28.07.2000**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **29.07.1999 04.11.1999**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1999/146414 1999/163650**

(33) Země priority: **US US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **14.08.2002**

(Věstník č. 8/2002)

(86) PCT číslo: **PCT/US00/20536**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO01/08712**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>:

**A 61 K 49/00**

(71) Přihlašovatel:

**EPIX MEDICAL, INC., Cambridge, MA, US;**

(72) Původce:

Lauffer Randall B., Brookline, MA, US;  
McMurry Thomas J., Winchester, MA, US;  
Dumas Stephane, Cambridge, MA, US;  
Kolodziej Andrew, Winchester, MA, US;  
Amedio John, Franklin, MA, US;  
Caravan Peter, Cambridge, MA, US;  
Zhang Zhaoda, Andover, MA, US;  
Nair Shrikumar, Lexington, MA, US;

(74) Zástupce:

**Hakr Eduard Ing., Přístavní 24, Praha 7, 17000;**

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Cílená multimerní zobrazovací činidla s  
multilokální vazebnou schopností**

(57) Anotace:

Multilokální cílené kontrastní činidlo pro magneticko rezonanční zobrazení, jehož podstata spočívá v tom, že obsahuje lešení, alespoň dva zbytky vázající se k cílovému objektu (TBMs) kovalentně vázané k různým atomům lešení, alespoň dva zbytky zlepšující obraz (IEMs), přičemž každý z uvedených zbytků zlepšujících obraz je buď kovalentně vázán k lešení nebo kovalentně vázán k mezilehlému linkeru, který je zase kovalentně vázán k lešení, každý zbytek zlepšující obraz (IEM) obsahuje chelát paramagnetického kovového iontu nebo optické barvivo, každý zbytek vázající se k cílovému objektu (TBM) je buď kovalentně vázán k atomům lešení nebo k linkeru a každý zbytek vázající se k cílovému objektu (TBM) má afinitu k cílovému objektu.

180302/HK

Cílená multimerní zobrazovací činidla s multilokální vazebnou schopností

Oblast techniky

Vynález se týká kontrastních činidel umožňujících zobrazení tkání a orgánů při stanovení diagnózy chorobných stavů. Zejména se vynález týká nových multimerních sloučenin, které vykazují zlepšenou afinitu k fyziologicky relevantním cílovým objektům, jakými jsou například proteiny, a překvapivě zlepšenou relaxivitu po jejich vázání k cílovému objektu.

Tyto sloučeniny obsahují:

- a) dva nebo více zbytků zlepšujících obraz (IEMs, Image Enhancing Moieties),
- b) dva nebo více zbytků vázajících se k cílovému objektu (TBMs, Target Binding Moieties) pro in vivo lokalizaci a multimerovou imobilizaci,
- c) "lešenářskou" strukturu pro připojení výše uvedených zbytků (tato struktura zde bude označována jako "lešení"), a
- d) případné spojovací členy pro připojení zbytků zlepšujících obraz (IEMs) k lešení (tyto spojovací členy zde budou označovány jako "linkery").

Vynález se rovněž týká farmaceutických kompozic

obsahujících tyto sloučeniny a způsobů použití uvedených sloučenin a kompozic pro zlepšení kontrastu při zobrazovacím procesu.

#### Dosavadní stav techniky

Techniky diagnostického zobrazování, mezi které patří například magnetickorezonanční zobrazování (MRI, Magnetic Resonance Imaging), rentgenové zobrazování, nukleární radiačně-farmaceutické zobrazování, zobrazování v ultrafialové a infračervené oblasti světla a ve viditelné oblasti světla, jakož i ultrazvukové zobrazování, jsou již v oblasti medicíně diagnostiky používány celou řadu let. V rámci tohoto zobrazování se dodatečně používají kontrastní látky s cílem zlepšit rozlišovací schopnost získaného obrazu nebo poskytnout specifickou diagnostickou informaci. V některých případech, například při zobrazování pomocí ultrazvuku, se započalo se zaváděním kontrastních látek teprve v nedávné době.

Aby bylo dosaženo účinného zobrazení, musí kontrastní látka interferovat s vlnovou délkou elektromagnetického záření, použitého v rámci zobrazovací techniky, pozměnit fyzikální vlastnosti tkáně k získání modifikovaného signálu anebo, jak je tomu v případě použití radiačně značených farmaceutických prostředků, poskytnout v dané lokalitě zdroj radioaktivního záření. Magnetickorezonanční zobrazování (MRI) a optické zobrazovací metody jsou jedinečné mezi zobrazovacími technikami tím, že poskytují komplexní signály, které jsou citlivé na chemické prostředí. Zatímco signály poskytnuté při rentgenovém zobrazování nebo při zobrazování za použití radioaktivně značených látek zůstávají stejné, nezávisle na tom, zda

jsou uvedené látky v plazmě volné, zda jsou vázané k proteinům nebo k jiným cílovým objektům nebo zda jsou vázané uvnitř kostí, některé kontrastní látky určené pro magnetickorezonanční zobrazení a optické zobrazení mají v různých fyziologických prostředích různé signálové charakteristiky. Optické barvivo po jeho vázání může vykazovat změny v jeho absorbanci, odrazivosti, fluorescenci, fosforescenci, chemiluminescenci, rozptylu nebo jiné spektrální vlastnosti. Je důležité, aby kontrastní látky byly dostatečně citlivé a přítomné v dosti vysoké koncentraci, aby uvedené signálové změny byly pozorovatelné.

Pokusy zlepšit kontrast zvýšením počtu zbytků zlepšujících obraz (IEM)

Cílená činidla by měla dopravit významné množství zobrazovacího zbytku do zacíleného objektu tak, aby bylo pozorováno dostatečné zlepšení signálu v průběhu zobrazování. Dosažení dostatečné citlivosti je velkým problémem zejména v případě magnetickorezonanční zobrazovací techniky, kde je zapotřebí k produkování adekvátního signálu koncentrace 10 až 1000  $\mu\text{M}$  zbytku zlepšujícího obraz. Tento problém může být pro cílená činidla ještě dále zkomplikován v případě, kdy je požadovaný cílový objekt přítomen v nízké koncentraci. Tak například pro zobrazení cílových objektů tvořených biologickými receptory, které jsou přítomné v nižší než mikromolární koncentraci, je zapotřebí k dosažení dostatečného kontrastu zobrazení vyšší zlepšení signálu v zacíleném místě. Zlepšení kontrastu bylo realizováno za použití 1) nosičů pro transport farmaceuticky účinných látek umožňujících dosáhnout vysokou lokální koncentraci kontrastní látky v daném místě, použitím 2) více zbytků

zlepšujících obraz (IEMs) v jediné kontrastní látce [viz například Martin V.V. a kol., *Bioconjug.Chem.*, 6: str. 616-23 (1995); Shukla R. a kol., *Mag.Reson.Med*, 35: str. 928-931 (1996); Ranganathan, R.S. a kol., *Invest. Radiol.*, 33: str. 779-797 (1998)], nebo použitím 3) specifických zbytků zlepšujících obraz (IEMs) majících definovanou strukturu se zlepšenou schopností zlepšit kvalitu signálu. Ideální cílené kontrastní činidlo by mělo účinně kombinovat zbytky zlepšující obraz (IEMs) k dosažení optimálního zlepšení zobrazovacího signálu.

Za účelem zabudování velkého počtu zbytků zlepšujících obraz do kontrastního činidla byly vneseny do vhodného vehikula pro transport farmaceuticky účinných látek, jakými jsou například polymerovaná vehikula nebo liposomy, vysoké koncentrace nízkomolekulárních kontrastních činidel [Bulte J.W. a kol., *J. Magn.Reson.Imaging*, 9: str.329-335 (1999)]. Bohužel takto získané materiály lze jen obtížně směřovat do cílového místa.

Za účelem dosažení uvedeného počtu zbytků zlepšujících obraz byla v rámci výzkumu například vytvořeny polymery, dendrimery a organické sloučeniny kombinované s množinou zbytků zlepšujících obraz. Velký počet zbytků zlepšujících obraz, jakými jsou například Gd(III)-cheláty pro magnetickorezonanční zobrazování, může být kovalentně připojen k polymerům [Schuhmann-Giampieri, G. a kol., *J.Invest. Rad*, 26: str. 969-974 (1991); Corot C. a kol., *Acta Rad*, 38:S412, str. 91-99] a dendrimerům [Jasques V. a kol., *J.Alloys Compd.*, 249: str.173-177 (1997); Margerum, L.D. a kol., *J.Alloys Compd.*, 249: str. 185-190 (1997); Toth E. a kol., *Chem.Eur.J.* 2:str. 1607-1615 (1996)]. Polymerní činidla typicky obsahují směs subjektů s širokou a komplexní distribucí molekulových hmotností. Tyto

heterogenní vlastnosti nepříznivě ovlivňují účinnost kontrastních činidel a znesnadňují jejich charakterizaci. Kromě toho je v rámci syntézy obtížné selektivně zavést zbytky vázající se k cílovému objektu společně s množinou zbytků zlepšujících obraz. Proto zde existuje potřeba mít k dispozici dobře definované homogenní molekuly pro použití ve funkci kontrastních činidel, které by byly schopné poskytnout adekvátní zlepšení obrazu v zacíleném místě.

Dendrimery (jako například hvězdicové nebo kaskádové dendrimery) teoreticky poskytují jediný vysokomolekulární subjekt, na který by bylo možné kovalentně navázat velký počet zbytků zlepšujících obraz [Fischer M. a kol. *Angew.Chem., Int.Ed.Eng.*, 38/7: str.884-905 (1999); Weiner, E.C. a kol., *Mag.Reson.Med*, 31: str. 1 - 8 (1994)]. Nicméně u dendrimerních, stejně jako polymerních činidel dochází k výrazným syntézním problémům, zejména v případě selektivního zavedení cílících skupin, které jsou specifické pro uvažovanou tkáň.

Také byly syntetizovány organické molekuly obsahující množinu zbytků zlepšujících obraz. Kontrastní činidla pro magneticko-rezonanční zobrazení tohoto typu jsou označovány jako "multimerní cheláty" nebo "multimery" a typicky obsahují 2 až 12 zbytků zlepšujících obraz [Shukla R. a kol., *Mag.Reson.Med.* 35: str. 928-931 (1996); Shukla R.B. a kol., *Acta Radiol.*, 412: str. 121-123 (1997); Ranganathan R.S. a kol., *Invest. Radiol.*, 33: str. 779-797 (1998)]. Uvedené multimerní cheláty mají následující výhody: 1) jsou homogenními molekulami v tom smyslu, že mají na rozdíl od polymerů a dendrimerů jednotnou velikost a strukturu, 2) mohou být snadno syntetizovány a čistěny, 3) lze do nich snadno zabudovat cílící skupiny. Bohužel bylo s určitým zklamáním zjištěno, že schopnost multimerních chelátů

zlepšit intenzitu magneticko-rezonančního zobrazovacího signálu je nízká. To je důsledkem toho, že zlepšení míry protonové relaxace (neboli "relaxivity"), které je v korelaci se zlepšením signálu, klesá se zvýšeným počtem zbytků zlepšujících obraz (IEMs). Takto je zapotřebí pro dosažení zlepšení signálu v cílovém místě mít k dispozici kontrastní činidla, u kterých uvedená relaxivita neklesá se zvyšujícím se počtem zbytků zlepšujících obraz.

Pokusy zlepšit kontrast snížením rotačního pohybu kontrastního činidla

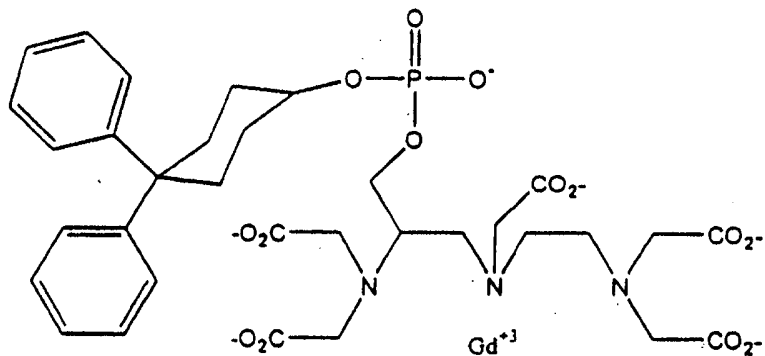
Byly učiněny pokusy zvýšit relaxivitu necílených multimerních kontrastních činidel pro magneticko-rezonanční zobrazení omezením rotačního pohybu. Pokusy omezit uvedený rotační pohyb byly soustředěny na 1) snížení flexibility molekuly nebo na 2) omezení rotačního pohybu vazbou k cílovému objektu.

Tak například necílená činidla byla syntetizována s tuhou strukturou, ke které jsou připojeny četné Gd(III)-cheláty [Shukla R. a kol., Mag. Reson. Med., 35: str.928-931 (1996); Shukla R.B. a kol. Acta Radiol., 412: str. 121-123 (1997); Ranganathan, R.S. a kol., Invest.Radiol., 33: str. 779-797 (1998); Jacques V. a kol., J.Allows Cmpd., 249: str. 173-177 (1997)]. Nicméně tyto struktury mají některé nedostatky. V první řadě byly relaxivity pro Gd(III)-ion, které byly dosaženy pro činidla obsahující více než dva cheláty, nižší než relaxivita pozorovaná u jediných chelátů, mezi které patří například MS-325. Lokální pohyb chelátu mohl být proto ještě dále redukován. Druhým nedostatkem je, že toto činidlo není cílené. I kdyby byla tato činidla cílená, tuhé multimerní

struktury by výrazně zvětšily nežádoucí pozadový signál, protože zlepšení signálu je dosaženo bez ohledu na to, zda je kontrastní činidlo vázáno k cílovému objektu či nikoliv.

Proto zde existuje potřeba mít k dispozici kontrastní činidla, která zlepšují obraz cílového objektu pouze v případě, že jsou vázána k cílovému objektu.

Rotační pohyb jediného zbytku zlepšujícího obraz může být účinně omezen po nekovalentním vázání k cílovému objektu, rezultujícím v 5 až 10-násobném zvýšení relaxivity pro formu vázanou k cílovému objektu [patent US 4,880,008]. Toto zlepšení relaxivity je stejné nebo lepší než zlepšení relaxivity pozorované pro zbytky zlepšující obraz, které jsou vázány k cílovému objektu kovalentně [Schmiedl U., Ogan M., Paaajanen H., Marotti M., Crooks L.E., Brito A.C. a Brasch R.C., Radiology (1987) 162: str. 205-210; Ogan M.D., Schmiedl U., Moseley M.E., Grodd W., Paaajanen H. a Brasch R.C. Invest.Radiol. (1987) 22: str. 665-71]. Příklady činidel, která využívají tento účinek jsou kontrastní činidla Gd-EOB DTPA cílená na proteiny jater [Runge V.M. Crit.Rev. Diagn. Imaging 38: str.207-30 (1997)] a kontrastní činidla Gd-BOBTA [Kirchin M.A. a kol., Invest.Radiol., 33: str. 798-809 (1998)] anebo kontrastní činidla MS-325 cílená na albumin [Lauffer R.B a kol., Radiology, 207: str. 529-538 (1998)], jakož i kontrastní činidla MP-2269 [Hofman Mark B.M. a kol. Academic Radiology, 5 (dodatek 1): S206-S209 (1998)]. Relaxivita zvýšená na přibližně sedminásobek je uvedena pro kontrastní činidlo MS-325 ( $47 \text{ nM}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) jako důsledek nekovalentní vazby k sérovému albuminu [Lauffer R.B. a kol., Radiology, 207: str.529-538 (1998)].



Obr.1 : Chemická struktura kontrastního činidla MS-325 pro magneticko-rezonanční zobrazování

Po navázání k albuminu dochází v případě monomerního kontrastního činidla MS-325, majícího strukturu zobrazenou na výše uvedeném obr.1, ke zvýšení zlepšení signálu. Jestliže je tento komplex vázán, potom se rozpadá pomalejší rychlostí než v nevázaném stavu, což má za následek vyšší relaxivitu. Při přidání množiny zbytků zlepšujících obraz k cíleným kontrastním činidlům, mezi která patří MS-325, však nedochází k dalšímu zlepšení kontrastu vzhledem k tomu, že relaxivita na jednotlivých gadoliniových centrech multimerní struktury klesá. Tak například multimer se čtyřmi Gd(III)-ionty vykazuje molekulární relaxivity pro Gd(III) pouze 9 až 13  $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  ve srovnání s relaxivitou 47  $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  pro MS-325, který obsahuje jediné Gd(III) [Martin V.V. a kol., Bioconjug. Chem., 6: str.616-23 (1995)]. Takto je relaxivita cíleného multimerního chelátu typicky mnohem

nižší pro Gd(III) než relaxivita analogického cílového jediného chelátu.

Dále zařazená tabulka 1 demonstruje skutečnost, že pouhé zvýšení počtu zbytků zlepšujících obraz je nedostatečné pro zlepšení celkové relaxivity, protože relaxivita vztažená na zbytek zlepšující obraz klesá se zvyšujícím se počtem zbytků zlepšujících obraz vzdor přítomnosti vazebné skupiny k cílovému objektu obsahující dva fenylové kruhy. K pochopení tabulky 1 je nezbytné definovat míru, do jaké kontrastní činidlo pro magneticko-rezonanční zobrazení vázané k cílovému objektu může dosáhnout své maximální možné relaxivity. Tato maximální relaxivita pro specifické kontrastní činidlo je přibližně rovna relaxivitě molekuly v případě, že je vázána k cílovému objektu ( $RI_{\text{vázaná}}$ ), jakým je například lidský sérový albumin (HSA, Human Serum Albumin). Střední  $RI_{\text{vázaná}}$  odpovídá normalizovanému měření střední relaxivity pro všechny vazebné subjekty za standardního souboru podmínek (jakými jsou například specifická koncentrace cílového objektu nebo proteinu, koncentrace farmaceuticky účinné látky, teplota, atd.), která je vyvážena vazebnou populací každého subjektu. Poněvadž hodnota  $RI_{\text{vázaná}}$  je normalizovanou kvantitou, může být takto provedeno porovnání relaxivit mezi různými molekulami ve vázaném stavu srovnáním hodnot pro  $RI_{\text{vázaná}}$ . Srovnání vypočítaných hodnot  $RI_{\text{vázaná}}$  poskytuje vhodný způsob pro srovnání sloučenin bez ohledu na jejich afinitu k cílovému objektu.

Výpočet střední  $RI_{\text{vázaná}}$  vyžaduje měření relaxivity volného chelátu  $RI_{\text{volná}}$ , jakož pozorované relaxivity  $RI_{\text{pozorovaná}}$  a procentické vazby činidla k roztoku cílového objektu, který typicky obsahuje 4,5 % cílového objektu,

například lidského sérového albuminu. Pozorovaná relaxivita je molárním zlomkem  $x$  vyvážený průměr  $R1_{\text{volná}}$  a  $R1_{\text{vázaná}}$ :

$$R1_{\text{pozorovaná}} = x_{\text{volná}} R1_{\text{volná}} + \sum_i x_i R1_{\text{vázaná}, i}$$

$$\text{kde } x_{\text{volná}} + \sum_i x_i = 1$$

$$\text{a } \sum_i x_i = x_{\text{vázaná}}.$$

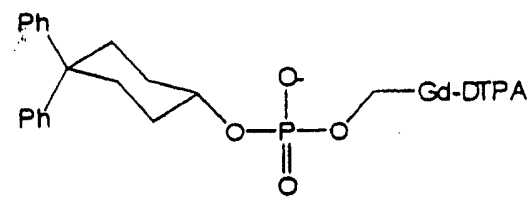
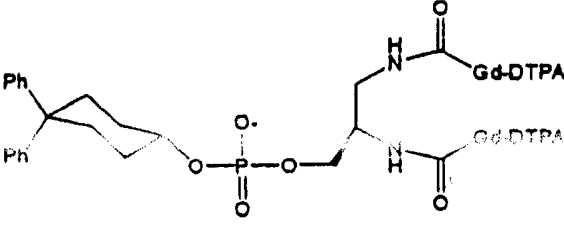
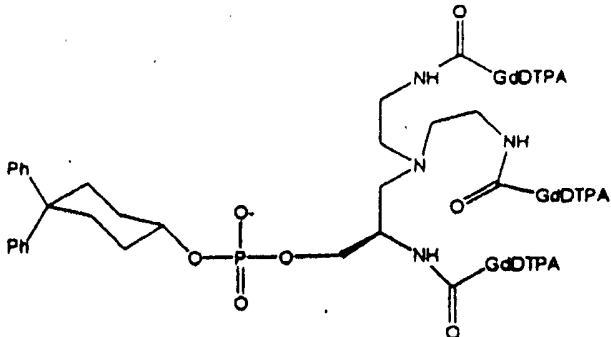
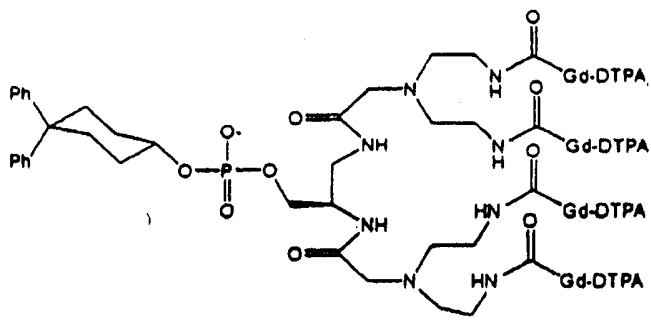
Takto:

$$R1_{\text{vázaná}} = \frac{R1_{\text{pozorovaná}} - x_{\text{volná}} R1_{\text{volná}}}{x_{\text{vázaná}}}$$

V následující tabulce 1 jsou uvedeny chemické struktury a vázané relaxivity řady kontrastních činidel cílených na albumin. V tomto souboru sloučenin je sloučenina s jediným zbytkem zlepšujícím obraz (t.j. MS-325) srovnána s řadou multimerů obsahujících množinu zbytků zlepšujících obraz, přičemž ve všech těchto sloučeninách je však přítomen stejný difenylcyklohexylový zbytek vázající se k albuminu a methylenfosfátová skupina.

Tabulka 1

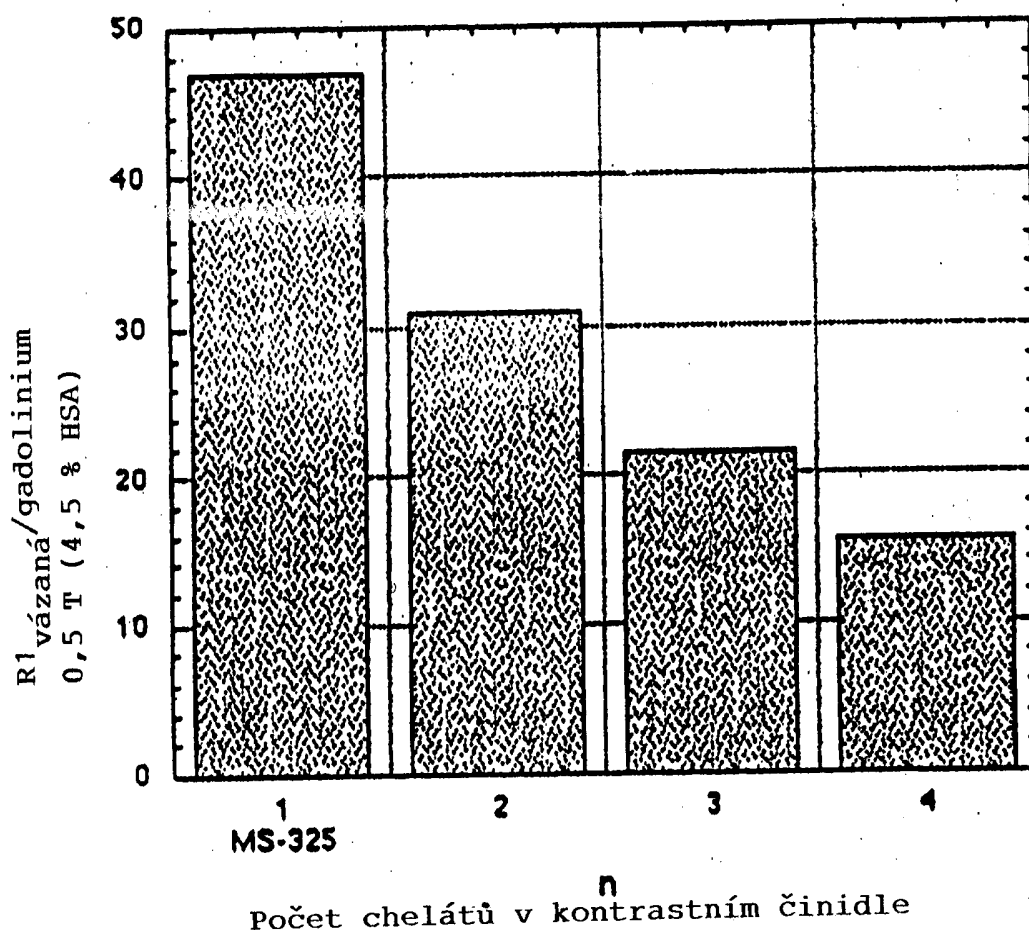
Chemické struktury a vázané relaxivity řady kontrastních činidel cílených na albumin. Difenylcyklohexylový zbytek vázající se k cílovému objektu (TBM) zůstává konstantní.

| Sloučenina | Chemická struktura                                                                  | Střední $R_1$ vázaná/<br>Gd(III) (20 MHz) | Celk. $R_1$ vázaná<br>(20 MHz) |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|--------------------------------|
| MS-325     |    | 47                                        | 47                             |
| M8-01      |   | 38.1                                      | 76.2                           |
| M8-02      |  | 23.6                                      | 70.7                           |
| M8-03      |  | 14.9                                      | 59.6                           |

Obr.2 představuje grafické zobrazení údajů uvedených v tabulce 1. Střední  $RI_{\text{vázaná}}$  pro zbytek zlepšující obraz (IEM), kterým je v tomto případě Gd(III)-chelát, při 20 MHz je vynesena proti počtu zbytků zlepšujících obraz (IEMs).

Obr.2

Graf vázané relaxivity (pro gadolinium) řady multimerních kontrastních činidel obsahujících jednu difenylcyklohexylovou skupinu vázající protein. Z uvedeného grafu je zřejmé, že s rostoucí velikostí multimeru klesá relaxivita pro gadolinium.



V molekulách uvedených v tabulce 1 a na obr.2 zůstávají struktura gadoliniového chelátu (IEM), methylenfosfátová skupina a difenylcyklohexylová skupina

(TBM) konstantní. Údaje v tabulce 1 a na obr.2 ukazují, že když počet chelátovaných paramagnetických kovových iontů v molekule roste, potom dochází ke snížení relaxivity vztažené na jeden kovový ion. Počet Gd(III)-chelátů se mění od jednoho (MS-325) do čtyř, avšak vzdor uvedenému čtyřnásobnému zvýšení počtu zbytků zlepšujících obraz (IEMs) vzroste celková relaxivita pouze o asi 50 %. Tento skrovný přírůstek celkové relaxivity je důsledek snížení relaxivity vztažené na jeden Gd(III)-ion. Je třeba poznamenat, že střední  $RI_{\text{vázaná}}$  vztažená na jeden Gd(III)-ion klesla z  $47 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  na  $14,9 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  přesto, že kontrastní činidlo bylo ve vázaném stavu. Tento pokles je důsledkem lokálního chelátového pohybu, který překvapivě roste na intenzitě s rostoucím počtem zbytků zlepšujících obraz vzdor množině aromatických kruhů v jediném zbytku vázajícím se k cílovému objektu (TBM).

Zřejmě zvýšení počtu chrlatizujících zbytků rovněž zvyšuje rotační volnost molekuly a to alespoň v blízkosti chelátové gadoliniové oblasti. Zvýšení relaxivity je zejména patrné, když velikost chelátové oblasti vzroste nad dva chelátované gadoliniové ionty vztažené na jednu multimerovou molekulu. Tak například v případě M8-03 je celková relaxivita vztažená na gadolinium rovna pouze  $15 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ , což je přibližně jedna třetina relaxivity pozorované pro MS-325. Celková relaxivita sloučeniny M8-03 je proto rovna pouze  $60 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ , což je právě 1,3-násobek celkové relaxivity činidla MS-325, i když je přítomno čtyřikrát více zbytků zlepšujících obraz. Je zřejmé, že takové skrovné zvýšení relaxivity neospravedlňuje dodatečné nároky spojené ze složitější syntézou multimeru a náklady spojené s vývojem takových kontrastních činidel pro magneticko-rezonanční zobrazování in vivo. Takto pouhé kombinování množiny zbytků zlepšujících obraz s jediným zbytkem vázajícím se k cílovému objektu neposkytuje

přiměřené zvýšení relaxivity. Existuje proto potřeba moci syntetizovat multimerní kontrastní činidla pro magneticko-rezonanční zobrazování, u kterých by byla relaxivita každého chelátu zachována i v případě, že vzroste počet jednotek zlepšujících obraz (IEMs).

Celková imobilizace kontrastního činidla vázaného k cílovému objektu může být pozoruhodně účinná při zvyšování relaxivity jediného chelátu (jako je tomu například u kontrastního činidla MS-325), avšak není účinná v případě multimerních chelátů. To znamená, že za účelem zvýšení relaxivity v každém chelátovém místě je nezbytně snížit celkovou rotační korelační dobu molekuly a současně snížit lokální chelátový pohyb v každém chelátovém místě. Existuje tedy potřeba nalézt mechanismus pro účinnou imobilizaci kontrastních činidel vázajících se k cílovému objektu, čímž by bylo dosaženo účinnějšího zlepšení signálu produkovaného v průběhu zobrazování.

Je zapotřebí nalézt způsob zlepšení signálového kontrastu pro specifické cílové objekty. Tento požadavek byl až dosud řešen 1) zvýšením počtu zbytků zlepšujících obraz (IEMs) nebo 2) snížením flexibility molekuly. Zvýšení počtu zbytků zlepšujících obraz (IEMs) bylo neúspěšné, protože kontrastní činidla nemají homogenní velikost a strukturu, dochází k potížím při jejich syntéze, je obtížné je zacílit a nebylo u nich dosaženo úměrnosti mezi zvýšením kontrastu obrazu a zvýšením počtu zbytků zlepšujících obraz (IEM). Snížení flexibility bylo zase neúspěšné vzhledem k tomu, že tuhá neflexibilní kontrastní činidla generují vysoký pozadový signál v případě, že jsou vázána. Vazba multimeru k cílovému objektu pomocí jediného zbytku vázajícího se k cílovému objektu (TBM) není účinná ani pokud jde o snížení flexibility, ani pokud jde o zvýšení

relaxivity. Proto zde existuje potřeba zlepšit kontrast obrazu u specifických cílových objektů zvýšením počtu zbytků zlepšujících obraz při současném snížení flexibility molekuly pouze v případě, kdy je vázána k cílovému objektu.

### Podstata vynálezu

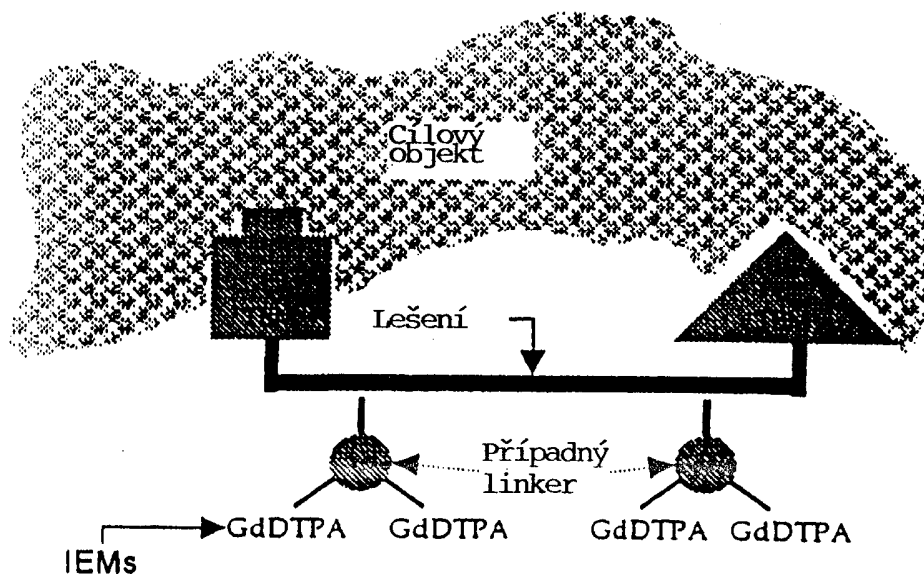
Vynález poskytuje mechanismus pro výrazné zlepšení účinnosti kontrastních činidel in vivo. Výrazná zlepšení kontrastu signálu v cílovém objektu jsou možná v případě, že multimerní kontrastní činidla jsou flexibilní v nevázaném stavu (což má za následek nízkou relaxivitu a slabý signál) a méně flexibilní ve vázaném stavu (což má za následek vysokou relaxivitu a silný signál). To znamená, že je důležité učinit multimerní kontrastní činidlo ve vázaném stavu tužším než v nevázaném stavu, poněvadž to minimalizuje pozadový signál v nevázaném stavu, zatímco ve vázaném stavu se zachová vysoká relaxivita. Taková činidla jsou vázána k proteinům nebo jiným cílovým objektům nekovalentními interakcemi ve dvou nebo více separátních místech neboli lokalitách. Takové multilokální vazby se dosáhne zabudováním do činidla dvou nebo více zbytků vázajících se k cílovému objektu, přičemž každý z těchto zbytků vázajících se k cílovému objektu má afinitu k jednomu nebo více místům na cílovém objektu.

Specifičtěji definováno, týká se vynález použití "multilokálních" nekovalentních interakcí mezi kontrastním činidlem s množinou zbytků zlepšujících obraz (IEMs) (multimer) a cílovým objektem s cílem současně 1) indukovat vazbu k cílovému objektu (čímž se dosáhne specifičnosti), 2) ukotvit několik zbytků zlepšujících obraz (IEMs) k cílovému objektu a 3) zpevnit strukturu množiny zbytků

zlepšujících obraz (IEMs). Základním znakem vynálezu je to, že kontrastní činidlo je méně flexibilní ve vázaném stavu než v nevázaném stavu. Vazba kontrastního činidla k cílovému objektu zvyšuje relaxivitu a signálovou intenzitu kovového chelátu IEM zvýšením celkové rotační korelační doby molekuly "kovový ion-vektor zobrazovacího atomů", t.j. vlastně omezením rotačního pohybu. Multilokální vazba umožňuje další zlepšení relaxivity zmenšením flexibility násobné chelátové struktury ve vázaném stavu a to jak obecně, tak i v lokálních místech, kde dochází k chelátovému pohybu. Flexibilita molekuly v nevázaném stavu poskytuje specifické výhody oproti dříve popsaným multimerním činidlům pro magneticko-rezonanční zobrazení s pevnými strukturami vázajícími cheláty, u kterých není rozdíl v tuhosti a tedy i ve flexibilitě ve vázaném a nevázaném stavu [Ranganathan R.S. a kol., Invest.Radiol., 33: str. 779-797 (1998)]. Multilokální vazebná koncepce pro multimerní cheláty je schematicky zobrazena na obr.3.

Obr.3.

Schematické zobrazení znázorňující klíčové složky příkladného multimerního kontrastního činidla vázaného k cílovému objektu pomocí multilokálních interakcí



- 1) Množina separátních zbytků vázajících se k cílovému objektu (TBMs) zprostředkuje vazbu k cílovému objektu (čímž poskytne specifickou a zlepšenou afinitu). Zbytky vázající se k cílovému objektu (TBMs) mohou být stejné nebo odlišné.
- 2) Když jsou zbytky vázající se k cílovému objektu (TBMs) vázány k cílovému objektu, ukotvují tyto zbytky multimerovou strukturu v několika polohách podél lešení, čímž dochází ke zpevnění množinové chelátové struktury.
- 3) Relaxivita je do značné míry zlepšena v případě, že je uvedená struktura vázána oproti tomu, kdy je volná v roztoku, čímž se zlepší zobrazovací kontrast specifických cílových objektů.

Kromě zlepšení obrazového kontrastu vynález nabízí i výhody v oblasti syntézy kontrastních činidel. Při syntéze není potřeba vytvořit ztuhlou chemickou strukturu (tvořenou například kondenzovanými kruhy nebo komplexním makrocyklem), neboť k imobilizaci a ztuhnutí dojde po multilokálním připojení k cílovému objektu. Proto v tomto případě existuje menší počet omezení, pokud jde o chemickou strukturu kontrastních činidel.

Další výhody zahrnují:

- a) multilokální vazba zvyšuje afinitu k proteinu a poskytuje větší specifickou při zacílení ve srovnání s vazbou zprostředkovanou jedinou interakcí [Kramer R.H. a Karpen J.W, Nature, 395: str.710-713 (1998); Clackson T. a kol., Proc.Natl.Acad.Sci., 95: str.10437-10442 (1998); Rao J. A kol., Science, 280: str.708-711 (1998); Mann D.A.a kol., J.Am.Chem.Soc., 120: str. 10 575-10 582 (1998); Spevak W. a kol., J.Med.Chem.,39: str. 1018-1020 (1996); Lee R.T. a kol, Arch. Biochem. Biophys., 299: str. 129-136 (1992)];
- b) multilokální vazba sníží rychlost, s jakou je činidlo odštěpováno od cílového objektu; zvýšení doby, po které zůstane činidlo vázáno k cílovému objektu, má za následek prodloužení periody diagnostického využití;
- c) multilokální vazba snižuje flexibilitu multiplové chelátové struktury, snižuje lokální chelátový pohyb a tím zlepšuje relaxivitu v každém kovovém centru;ke ztuhnutí kontrastního činidla ve vázaném stavu oproti volné molekule dochází pouze po vázání kontrastního činidla

k cílovému objektu, čímž se dosahuje vyšší zobrazovací kontrast; volná molekula indukuje pouze relativně malou signálovou změnu ve srovnání s molekulou ve vázaném stavu; v důsledku toho existuje překvapivě větší rozdíl mezi signálem indukovaným vázanou formou a signálem indukovaným volnou molekulou; kontrastní činidla, která jsou tuhá jak ve vázaném, tak i v nevázaném stavu tuto diferenční vlastnost postrádají;

- d) vazebně závislá změna intenzity signálu je rovněž aplikovatelná na ostatní zobrazovací modality, kde změna intenzity signálu může doprovázet přechod do vázaného stavu, přičemž takovou zobrazovací modalitou je například optické zobrazování; po vázání kontrastního činidla může dojít ke zvýšení nebo snížení intenzity signálu; v některých případech se ukázalo, že snížení signálu bylo v korelaci s tuhostí molekuly [Rimet O., Chauvet M., Dell'Amico M., Noat G. a Bourdeaux M. Eur. J. Biochem (1995) 228: str. 55-59]; v jiných případech dojde po vázbě činidla k cílovému objektu ke zvýšení intenzity signálu [Sudlow G., Birkett D.J. a Wade D.N. Mol.Pharmacol 12: str.1052-61 (1976); Sudlow G., Birkett D.J. a Wade D.N. Mol.Pharmacol 11: str. 824-32 (1975); Kane C.D. a Bernlohr D.A. Anal.Biochem 233: str. 197-204; Lakowica J.R. Principles of Fluorescence Spektroskopie, Plenum Press, New York, NY, str.211-213 (1983))].

Multilokální vazba může poskytnout buď výrazně sníženou intenzitu signálu (a tudíž výrazně zvýšený signálový kontrast) nebo výrazně zvýšenou intenzitu ve srovnání s optickým kontrastním činidlem majícím pouze jeden zbytek vázající se k cílovému objektu (TBM). V obou případech změna v intenzitě signálu bude mít za následek zlepšený

signálový kontrast jakožto důsledek vázání kontrastního činidla k cílovému objektu.

Multilokálně vazebná kontrastní činidla podle vynálezu obsahuje zbytky zlepšující obraz (IEMs), lešení, ke kterému je připojena množina zbytků zlepšujících obraz (IEMs) a to buď přímo nebo pomocí případných linkerů, a alespoň dva separátní zbytky vázající se k cílovému objektu (TBMs). Posledně uvedené zbytky vázající se k cílovému objektu mohou být stejné nebo odlišné. V některých případech může lešení obsahovat zbytek zlepšující obraz nebo část zbytku zlepšujícího obraz, přičemž některé chelatizující zbytky mohou takto rovněž sloužit jako lešení nebo jako část lešení.

Tyto multimerní/multilokálně vazebné sloučeniny jsou jedinečné tím, že jejich lokální pohyb zbytků zlepšujících obraz je omezen a jejich vázaná relaxivita je výrazně zlepšená nekovalentní vazbou alespoň dvou zbytků vázajících se k cílovému objektu (TBMs) k cílovému objektu v alespoň dvou separátních místech (lokalitách) podél multimerní struktury. Tyto interakce umožňují, aby se multimer vázal k cílovému proteinu "pseudo-cyklickým" nebo "zipovitým" způsobem. Tento typ vazby překvapivě snižuje flexibilitu multimeru, obsahujícího zbytky vázající se k cílovému objektu (TBMs), lešení a individuální zbytky zlepšující obraz (IEMs). Takto dochází u zbytků zlepšujících obraz (IEMs), které zahrnují cheláty, k omezení lokálního chelátového pohybu a k pozoruhodnému zlepšení signálů magneticko-rezonančního zobrazení, poněvadž je zvýšena relaxivita v každém zbytku zlepšujícím obraz (IEM). Toto zvýšení odlišuje kontrastní činidla podle vynálezu od kontrastních činidel dosavadního stavu techniky, která jsou vázána k cílovému objektu prostřednictvím pouze jediného

zbytku vázajícího se k cílovému objektu (TBN) a která takto nejsou "pseudo-cyklicky" nebo "zipovitě" vázána k cílovému objektu. Kontrast zobrazení je ještě dále zlepšen multimerní/multilokálně vazebnou strukturou, poněvadž tato struktura produkuje relativně slabý signál v nevázaném stavu.

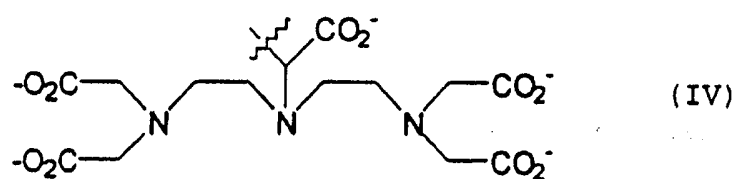
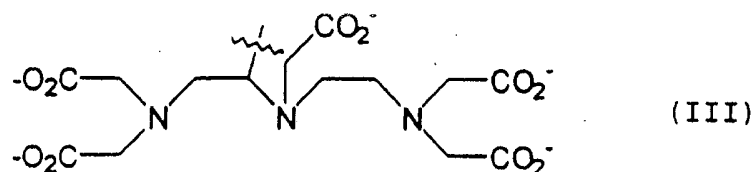
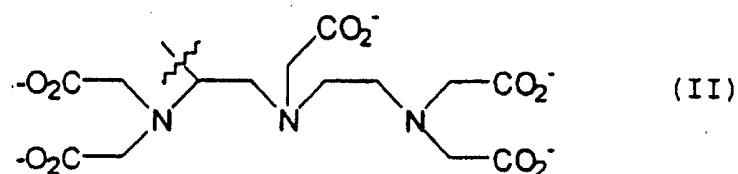
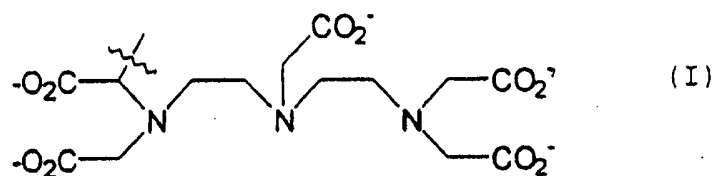
Vynález je použitelný pro všechny aplikace cíleného magneticko-rezonančního a optického zobrazení, včetně použití činidel zlepšujících obraz zacílených na biologické struktury, jakými jsou sérový albumin a ostatní diagnosticky relevantní cílové objekty, jakými jsou krevní sraženiny, a to zejména v rámci těch aplikací, kde existuje množina vazebných míst pro vazbu multimerního/multilokálně vazebného kontrastního činidla. Taková vazebná místa nemusí být identická a měla by být v dostatečné blízkosti k tomu, aby mohla být společně využita pro spojení s kontrastním činidlem prostřednictvím zbytků vázajících se k cílovému objektu (TBMs).

#### Detailní popis vynálezu

Následující detailní popis vynálezu slouží k tomu, aby mohl být vynález pochopen v celém jeho rozsahu.

Významy obecně používaných chemických zkratek, které nejsou explicitně definované v této popisné části, mohou být nalezeny v The American Chemical Society Style Guide; Second Edition; American Chemical Society, Washington, D.C. (1997) nebo v Journal of Organic Chemistry; Guidelines to Author (Revised May 2000), Copyright 2000 American Chemical Society.

V rámci této přihlášky se DTPA vztahuje ke struktuře některého ze čtyř následujících vzorců I až IV:



Výraz "specifická afinita" se zde vztahuje ke schopnosti kontrastního činidla spočívající v tom, že toto činidlo může být zachyceno, zadrženo nebo vázáno specifickou biologickou složkou v míře vyšší než je míra zachycení, zadržení nebo vázání ostatních složek stejnou specifickou biologickou složkou. Kontrastní činidla, která mají tuto vlastnost, jsou zde uváděna jako "cílená"

kontrastní činidla nebo jako činidla "zacílená" na cílový objekt. Kontrastní činidla, která uvedenou vlastnost postrádají, jsou zde uváděna jako "nespecifická" kontrastní činidla.

Výraz "relaxivita" se vztahuje ke zvýšení buď kvantity  $1/T_1$  nebo  $1/T_2$ , vztažené na milimolární koncentraci paramagnetického iontu, kde  $T_1$  znamená axiální nebo "spin-mřížka"-relaxační dobu a  $T_2$  znamená transversální nebo "spin-spin"-relaxační dobu protonů vody nebo jiných spektroskopických jader, včetně protonů nacházejících se v molekulách jiných než jsou molekuly vody. Jednotkou relaxivity je  $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ .

Zde použitý výraz "otevřené koordinační místo" se vztahuje k místu na kovovém chelátu, které je obecně okupované molekulami vody nebo rozpouštědla.

Zde použitý výraz "konstanta tvorby" lze definovat jako rovnovážná konstanta reakce popisující tvorbu dané sloučeniny.

Zde použitý výraz "multimer" je definován jako kontrastní činidlo nebo jeho podjednotka obsahující dva nebo více zbytků zlepšujících obraz (IEMs).

Zde použitý výraz "multilokální" se vztahuje ke dvěma nebo více polohám kovalentního připojení k "lešení" (tento výraz bude definován níže) kontrastního činidla pomocí zbytků vázajících se k cílovému objektu (TBMs).

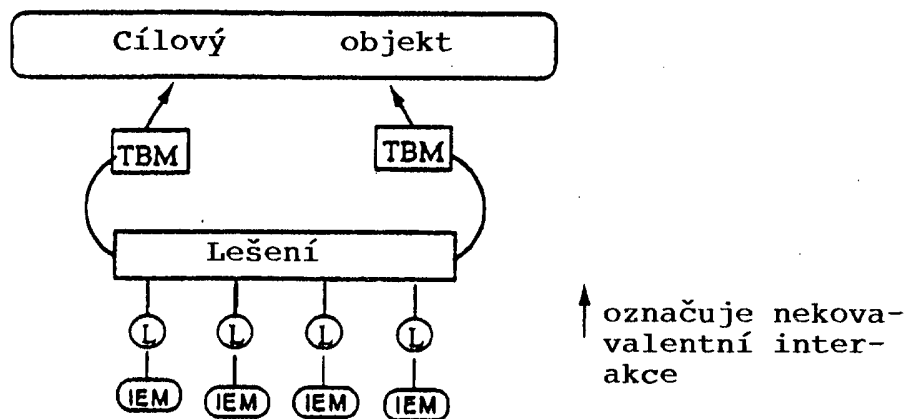
Zde použitý výraz "multilokálně vazebný" se vztahuje k nekovalentním interakcím dvou nebo více zbytků vázajících se k cílovému objektu (TBMs) s cílovým objektem. Tyto nekovalentní interakce jsou vzájemně nezávislé a mohou být mezi jiným hydrofobními interakcemi, hydrofilními interakcemi, interakcemi typu dipol-dipol, interakce typu "pi-stacking" nebo interakcemi typu Lewisova kyselina-báze.

Zde použitý výraz "pseudo-cyklická struktura" se vztahuje ke kontrastnímu činidlu vázanému nekovalentními interakcemi k cílovému objektu ve dvou různých místech pomocí zbytků vázajících se k cílovému objektu (TBMs) (viz obr.4).

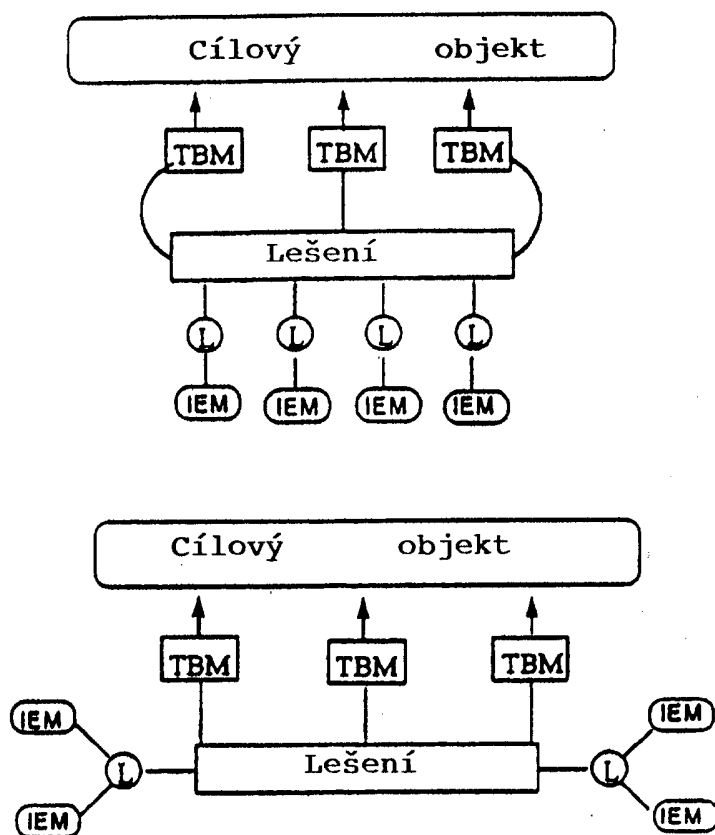
Obr. 4

Reprezentativní příklady multilokálně vazebných struktur

"Pseudo-cyklická" vazebná struktura:



"Zipové" vazebné struktury:



Zde použitý výraz "zipová" struktura se vztahuje ke kontrastnímu činidlu vázanému nekovalentními interakcemi k cílovému objektu ve třech nebo více různých místech pomocí tří zbytků vázajících se k cílovému objektu (TBM) (viz obr.4).

Vynález se týká nových sloučenin, které zlepšují kontrast při diagnostickém zobrazení v důsledku změny flexibility po vázání těchto sloučenin k cílovému objektu. Tyto sloučeniny obsahují:

- a) dva nebo více zbytků zlepšujících obraz (IEMs),
- b) dva nebo více zbytků vázajících se k cílovému objektu (TBM) zajišťujících lokalizaci a ztuhnutí multi-meru,
- c) lešenářskou strukturu pro připojení výše uvedených zbytků ("lešení") a
- d) případné spojovací členy pro připojení zbytků zlepšujících obraz (IEMs) k lešení ("linkery").

Techniky diagnostického zobrazení neomezujičím způsobem zahrnují magneticko-rezonanční zobrazení a zobrazení v ultrafialové, viditelné a infračervené oblasti světelného záření.

Zbytek zlepšující obraz (IEM)

Zbytkem zlepšujícím obraz (IEM) může být v rámci vynálezu chemikálie nebo látka, která je použita k poskytnutí signálu nebo ke zlepšení kontrastu v průběhu

zobrazování. Kromě toho zbytek zlepšující obraz (IEM) nebo část zbytku zlepšujícího obraz mohou být případně použity ve funkci lešení nebo ve funkci části lešení a mohou mít minoritní cílící funkci.

Zbytek zlepšující obraz může být tvořen organickou molekulou, iontem kovu nebo chelátem. Četné příklady zbytků zlepšujících obraz (IEMs) byly popsány v Bonnemain B., J-Drug Target., 6: str. 167-74 (1998); Swanson D.P. a kol., Pharmaceuticals in Medical Imaging: Radiopaque Contrast Media, Radiopharmaceuticals, Enhancement Agents for Magnetic Resonance Imaging and Ultrasound, McGraw Hill, Inc., (1990); Johnson I. Histochem.J., 30: str. 123-40 (1998)].

Obzvláště použitelným zbytkem zlepšujícím obraz (IEM) je fyziologicky kompatibilní kovový chelát s jedním nebo více cyklickými nebo acyklickými chelatizujícími činidly v komplexu s jedním nebo více kovovými ionty. Výhodné kovové ionty pro optické zobrazení zahrnují ionty kovů s atomovými čísly 13, 21 až 31, 39 až 42, 44 až 50 nebo 57 až 83. Výhodné kovové ionty pro magneticko-rezonanční zobrazení zahrnují ionty kovů s atomovými čísly 21 až 29, 42, 44 nebo 57 až 83 a výhodněji paramagnetické formy iontů kovů s atomovými čísly 21 až 29, 42, 44 nebo 57 až 83. Obzvláště výhodné paramagnetické kovové ionty jsou zvoleny z množiny zahrnující Gd(III), Fe(III), Mn(II a III), Cr(III), Cu(II), Dy(III), Tb(III a IV), Ho(III), Er(III), Pr(III) a ER(II a III). Nejvýhodnějším paramagnetickým iontem je Gd(III).

V případě, že zbytkem zlepšujícím obraz (IEM) je kovový chelát, potom tento chelát nesmí výraznou měrou disociovat v průběhu průchodu zobrazovacího činidla tělem, včetně

doby, kdy se zobrazovací činidlo váže k cílové tkáni. Významnější uvolňování volných kovových iontů by mohlo mít za následek obecně nepříjemnou toxicitu zobrazujícího činidla.

Obecně se míra toxicity kovového chelátu uvádí jako jeho míra disociace in vivo před jeho vyloučením z těla. Toxicita se obecně zvyšuje s množstvím volného kovového iontu, což znamená, že vysoká konstanta tvorby (definována výše) je výhodná, pokud jde o eliminaci toxických koncentrací volných kovových iontů. Obzvláště výhodné jsou konstanty tvorby rovné alespoň  $10^{15} \text{ M}^{-1}$  nebo rovné alespoň  $10^{16} \text{ M}^{-1}$  nebo rovné alespoň  $10^{17} \text{ M}^{-1}$  nebo rovné alespoň  $10^{18} \text{ M}^{-1}$  nebo rovné alespoň  $10^{19} \text{ M}^{-1}$  nebo rovné alespoň  $10^{20} \text{ M}^{-1}$  nebo rovné alespoň  $10^{22} \text{ M}^{-1}$  nebo rovné alespoň  $10^{24} \text{ M}^{-1}$  anebo konstanty tvorby ještě vyšší. V případě, že je kinetická disociace kovového iontu velmi pomalá, potom může být dostatečný komplex mající nižší konstantu tvorby, t.j. konstantu tvorby alespoň rovnou  $10^{10} \text{ M}^{-1}$ .

Toxicita zobrazovacího činidla je rovněž závislá na počtu otevřených koordinačních míst v komplexu. Obecně méně vodných koordinačních míst snižuje tendenci chelatového činidla uvolňovat paramagnetický kov. Výhodně proto komplex obsahuje dvě, jedno nebo žádné otevřené koordinační místo. Přítomnost více než dvou otevřených míst by nepříjemně zvýšila toxicitu činidla způsobenou uvolňováním kovového iontu in vivo.

Relaxivity  $R_1$  a  $R_2$ , definované jako zvýšení  $1/T_1$  resp.  $1/T_2$ , vztažené na mM kovového iontu, určují schopnost kontrastního činidla zlepšit relaxační míru spektroskopických nebo zobrazovacích jader. Jednotkou

relaxivity je  $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ . U většiny obvyklých forem klinického magneticko-rezonančního zobrazení nebo magneticko-rezonančního zobrazení na bázi protonů vody je relaxivita vyšší v případě, kdy paramagnetický ion vázaný k chelatizujícímu ligandu má ještě jedno nebo více otevřených koordinačních míst pro vodnou výměnu (R.B.Lauffer, Chemical Reviews, 87: str.901-927 (1987)). Nicméně musí zde existovat vyvážení se stabilitou kovového chelátu, která obecně klesá se zvyšujícím se počtem otevřených koordinačních míst, a výše definovanou toxicitou. Výhodně proto, a to s výjimkou železných chelátů  $\text{Fe(II)}$  nebo  $\text{Fe(III)}$ , komplex obsahuje pouze jedno nebo dvě otevřená koordinační místa. Pro  $\text{Gd(III)}$  jsou nejvýhodnější jedno nebo dvě otevřená koordinační místa.

Za účelem dosažení účinného zlepšení obrazů při magneticko-rezonančním zobrazení, musí být uvedený komplex schopen zvýšit relaxační rychlost neboli relaxivity  $1/T_1$  (podélná relaxivita neboli spin-mřížková relaxivita) nebo/a  $1/T_2$  (příčná relaxivita nebo spin-spinová relaxivita) spektroskopického jádra. Spektroskopickým jádrem je výhodně proton vody, avšak ostatní obvyklá spektroskopická jádra zahrnují  $^{31}\text{P}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{23}\text{Na}$ ,  $^{19}\text{F}$  a protony nacházející se v jiných molekulách rozdílných od molekuly vody. Spektroskopické jádro může obsahovat zbytky IEM a TBM, jiné biomolekuly nebo injikované biologické značkovače.

V případě činidel pro rezonančně-magnetické zobrazení obecně dochází ke zvýšení relaxivit ( $1/T_1$  nebo  $1/T_2$ ) dipól-dipólovými interakcemi mezi paramagnetickým iontem kontrastního činidla a jádru podstupujícími relaxaci (jakými jsou například atomy vodíku v molekule vody). Je známo, že účinnost uvedené dipolární interakce (t.j. relaxivity) se zlepší v případě, kdy se zpomalí rychlost, s

jakou rotuje uvedený vektor definovaný dvěma dipóly (t.j. vektor definovaný paramagnetickým iontem a atomem vodíku vody) (R.B. Lauffer, Chemical Reviews, 87: str. 901-927 (1987)).

Čas, který vektor potřebuje k rotační difuzi jednoho radiánu se označuje jako "rotační korelační čas"; obrácená hodnota tohoto rotačního korelačního času je "rotační rychlost". Obecně velké molekuly rotují v roztoku pomaleji než menší molekuly. Jednou z metod zvýšení relaxivity je vytvoření nekovalentního aduktu mezi kontrastním činidlem s malou molekulou a makromolekulou. Vytvořením uvedeného aduktu bude rotační korelační čas dipolárního vektoru v podstatě stejný jako rotační korelační čas uvedené makromolekuly. Nicméně malá molekula může být stále ještě schopna rotovat okolo jedné nebo více os (tak zvaný "lokální chelátový pohyb"). Rotační korelační čas uvedeného dipolárního vektoru je potom závislý na uvedeném lokálním chelátovém pohybu a na celkovém pohybu makromolekulového aduktu. Nekovalentní adukty makromolekul budou mít rotační korelační časy, které jsou kratší než rotační korelační čas makromolekuly nebo které jsou rovné rotačnímu korelačnímu času makromolekuly; čím menší je zde lokální chelátový pohyb, tím těsněji se rotační korelační čas nekovalentního aduktu blíží rotačnímu korelačnímu času makromolekuly.

V případě kontrastních činidel pro magneticko-rezonanční zobrazení dochází ke zvýšení relaxivity obecně dipól-dipólovými interakcemi mezi kovovým iontem kontrastního činidla a jádru podstupujícími relaxaci (kterými jsou například vodíkové atomy vody). Kromě zvýšení hodnot  $1/T_1$  nebo  $1/T_2$  tkáňových jader dipól-dipólovými interakcemi mohou činidla pro magneticko-rezonanční zobrazení ovlivnit dvě další magnetické vlastnosti, což

ještě dále zvyšuje jejich hodnotu a použitelnost v rámci klinických aplikací:

- 1) zbytky zlepšující obraz (IEMs) obsahující kovový chelát s vysokou magnetickou susceptibilitou, zejména cheláty iontů Dy, Gd, Tb nebo Ho, mohou změnit při magneticko-rezonančním zobrazení signálovou intenzitu tkání vytvořením mikroskopických magneticko-susceptibilitních gradientů (A. Villringer a kol., Magn. Reson. Med., 6: str. 164-174 (1998)); pro tuto aplikaci nejsou požadována žádná otevřená koordinační místa na chelátu;
- 2) zbytek zlepšující obraz (IEM) obsahující kovový chelát (například Tm nebo Dy) může být rovněž použit k posunutí rezonanční frekvence spektroskopického jádra; spektroskopickým jádrem je výhodně proton vody, i když další obvyklá spektroskopická jádra zahrnují  $^{31}\text{P}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{23}\text{Na}$ ,  $^{19}\text{F}$  a protony nacházející se v molekulách jiných, než je molekula vody; spektroskopické jádro může obsahovat kontrastní činidlo, cílový objekt nebo vodu; v tomto případě může být použito žádné až tři otevřená koordinační místa a to v závislosti na povaze spektroskopického jádra a na použité strategii.

Ve funkci zbytků zlepšujících obraz (IEMs) mohou být v rámci jednotlivých provedení vynálezu použity četné chelatizující ligandy. Takové chelatizující ligandy neomezujícím způsobem zahrnují deriváty kyseliny diethylenetriaminpentaoctové (DTPA) a jejich deriváty, 1,4,7-triazacyklonan, 1,4,7,10-tetraazacyklodekan (cyklen) a jeho deriváty, 1,7-bis(terc-butylester kyseliny 1,4,7,10-tetraazacyklodekanoctové) (DO2A-t-bu-ester), 1,4,7-tris(terc-butylester kyseliny 1,4,7,10-tetraazacyklodekanoctové) (DO3A-t-bu-ester), 1,4,7-tris(terc-butoxykarbonyl)-1,4,7-tetraazacyklododekan

(D03-t-BOC),  
kyselina 1,4,7,10-tetraazacyklodekan-1,4,7,10-tetraoctová  
(DOTA) a její deriváty,  
kyselina 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetrakis-  
(methylenfosfonová) (DOTP),  
kyselina 1,4,7,10-tetraazacyklodekan-1,4,7,10-a,a',a'',-  
a'''-tetrakis(methyloctová) (DOTMA),  
kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA,  
kyselina 1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan-1,4,8,11-tetra-  
octová (TETA,  
ethylenbis-(2-hydroxyfenylglycin) (EHPG) a jeho deriváty,  
včetně 5-Cl-EHPG, 5-Br-EHPG, 5-Me-EHPG, 5-t-Bu-EHPG a  
5-sek-Bu-EHPG,  
kyselina benzodiethylentriaminpentaoctová (benzo-DTPA) a  
její deriváty, včetně dibenzo-DTPA, fenyl-DTPA,  
difenyl-DTPA, benzyl-DTPA a dibenzyl-DTPA,  
kyselina bis-2(hydroxybenzyl)ethylendiamindioctová (HBED)  
a její deriváty,  
skupina makrocyclických sloučenin, které obsahují alespoň  
3 uhlíkové atomy, výhodně alespoň 6 uhlíkových atomů a  
obsahují alespoň dva heteroatomy (atom kyslíku nebo/a atom  
dusíku), přičemž uvedené makrocyclické sloučeniny mohou  
obsahovat jeden kruh nebo dva nebo tři kruhy spojené  
dohromady v polohách heteroatomových kruhových prvků,  
například deriváty benzo-DOTA, dibenzo-DOTA a benzo-NOTA,  
kde NOTA znamená kyselinu 1,4-triazacyklononan.N,N',N''-tri-  
octovou, benzo-TETA, benzo-DOTMA, benzo-TETMA, kde TETMA  
znamená kyselinu 1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan-1,4,8,11-  
(methyloctovou),  
deriváty kyseliny 1,3-propylendiamintetraoctové (PDTA) a  
triethylentetraaminhexaoctové (TTHA), a  
deriváty 1,5,10-N,N',N''-tris(2,3-dihydroxybenzoyl)aminome-  
thylbenzen (MECAM).

V rámci dosavadního stavu techniky jsou známá četná chelatizující činidla pro kontrastní činidla pro magneticko-rezonanční zobrazení. Tyto kovové cheláty mohou být rovněž použity pro další formy biologického zobrazení (takovou formou je například optické zobrazení). Takto byla nedávno popsána řada fluorescenčně detekovatelných kontrastních činidel pro magneticko-rezonanční zobrazení [Hüber M.M. a kol, Bioconjugate Chem., 9: str. 242-249 (1998)]. Zbytky zlepšující obraz (IEMs) pro magneticko-rezonanční zobrazení výhodně zahrnují gadoliniové cheláty, jakými jsou zejména kyselina gadoliniumdiethylenetriaminpentaoctová (GdDTPA), kyselina gadoliniumtetraamin-1,4,7,10-tetraazacyklododekan-N, N', N'', N'''-tetraoctová (GdDOTA) a kyselina gadolinium-1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7-trioctová (GdDO3A).

V daném oboru je známo, že v rámci některých aplikací může být Gd(III) nahrazeno jinými kovy. Výhodným chelátorem pro použití v rámci vynálezu je DTPA. Příklady reprezentativních chelátorů a chelatizujících skupin přicházejících v úvahu v rámci vynálezu jsou popsány v mezinárodních patentových přihláškách WO 98/18496, WO 86/06605, WO 91/03200, WO 95/28179, WO 96/23526, WO 97/36619, PCT/US98/01473, PCT/US98/20182 a v patentu US 4,899,755.

Zbytek vázající se k cílovému objektu (TBM)

V souladu s vynálezem jsou druhou složkou kontrastního činidla dvě nebo více zbytků vázajících se k cílovému objektu (TBMs). Tyto zbytky vázající se k cílovému objektu (TBMs) 1) umožňují vazbu kontrastního činidla k proteinům

nebo jiným cílovým objektům a 2) snižují flexibilitu molekuly ve vázaném stavu. To vytváří zvýšenou koncentraci zobrazovacího činidla v místě, které má být zobrazeno a zvyšuje takto rovněž relaxivitu ve vázaném stavu. Při zobrazení vaskulárního krevního řečiště je výhodným cílovým objektem sérový protein. Další proteinové cílové objekty neomezujícím způsobem zahrnují alfa-kyselinový glykoprotein, fibrinogen, fibrin a kolagen. Při zobrazení krevní sraženiny je výhodným cílovým objektem fibrin. Zbytek vázající se k cílovému objektu (TBM) musí být proto zvolen tak, aby bylo dosaženo specifičnosti a vysoké vazebné afinity vůči uvažovanému proteinu. Poněvadž lidský sérový albumin (HSA, Human Serum Albumin)) je v krevním séru přítomen ve vysoké koncentraci (přibližně v koncentraci 0,6 mM) a vykazuje vysokou afinitu k celé řadě molekul, je tento albumin výhodným cílovým plasmovým proteinem pro kontrastní činidla určená pro zobrazení krevního řečiště. Lidský sérový albumin je takto obzvláště výhodným cílovým objektem pro kardiovaskulární zobrazení.

Celá řada lipofilních nebo anfifilních zbytků vázajících se k cílovému objektu (TBMs) se účinně váže k různým cílovým objektům, zahrnujícím také lidský sérový albumin (HSA). Tyto zbytky vázající se k cílovému objektu neomezujícím způsobem zahrnují aromatické a nasycené nebo nenasyčené alifatické skupiny obsahující 4 až 200 uhlíkových atomů, přičemž každý uhlíkový atom je případně substituován nebo nahrazen atomem kyslíku, atomem dusíku, atomem halogenu, atomem síry nebo ostatními atomy, které mohou být kovalentně vázány k atomu uhlíku. Pro vysoce specifickou vazbu k dalším proteinovým cílovým objektům je mnohdy zapotřebí mít k dispozici speciální cílicí skupiny. Cílicí skupiny s dostatečně vysokou afinitou specifičností mohou být identifikovány za použití moderních technik, mezi které patří například kombinatorní chemie, vysoce výkonný

screening, metoda typu "phage display", systemická evoluce ligandů exponenciálním obohacením (SELEX) a další metody, které jsou například popsány v patentech US 5,475,096, 5,595,877 a 5,270,163 [viz Gold a kol. Ann.Rev.ofBiochem., 64: str. 763-797 (1995)].

Míra vázání zbytku vázajícího se k cílovému objektu (TBM) k cílovému objektu, jakým je lidský sérový albumin nebo fibrin, může být určena četnými rovnovážnými vazebnými metodami. Tak například vazba k lidskému sérovému albuminu může být měřena ultrafiltrací. Při obvyklém měření vazby za použití ultrafiltrace se cílicí skupina smísí s 4,5% (hmotn./obj.) lidským sérovým albuminem v pufru s pH 7,4. Tento vzorek se zavede do komerčně dostupného odstředivého zařízení, vybaveného separačním filtrem se separačním prahem rovným molekulové hmotnosti 30 000 (Millipore Ultrafree MC Low Binding Regenerated Cellulose, separační práh 30 kDa, katalogové označení UFC3LTK00), který propouští cílicí skupinu, avšak nepropouští lidský sérový albumin. Malá část (5 až 10 %) z celkového objemu vzorku se odstředivě zfiltruje při 2000 x g po dobu 20 minut skrze uvedený separační filtr, načež se stanoví koncentrace nevázané cílicí skupiny v získaném filtrátu.

Při měření vazby k fibrinu může být v jamce mikrotitrační desky vytvořena fibrinová sraženina, která se uvede do styku s cílicí skupinou. Po inkubační době, která je dostatečná k ustavení rovnovážného stavu, se supernatant oddělí odsáním (nerozpustný fibrin zůstane vázán ve formě gelové sraženiny na dně jamky). Potom se stanoví koncentrace nevázané cílicí skupiny v supernatantu.

Při obou uvedených metodách se koncentrace vázané cílicí skupiny stanoví jako rozdíl mezi celkovou původně přítomnou koncentrací cílicí skupiny a koncentrací nevázané cílicí skupiny po provedení vazebného testu. Vázaná frakce je rovna koncentraci vázané cílicí skupiny dělené celkovou koncentrací cílicí skupiny. Výhodně alespoň 10 %, výhodněji alespoň 50 %, ještě výhodněji alespoň 80 % a ještě výhodněji alespoň 90 % kontrastního činidla je vázáno k požadovanému cílovému objektu při fyziologicky relevantních koncentracích činidla a cílového objektu. Výhodněji alespoň 92 %, nebo dokonce ještě výhodněji alespoň 94 % a nejvýhodněji 96 % nebo ještě více kontrastního činidla je vázáno k cílovému objektu při stanovení provedeném za použití ultrafiltrace nebo mikrotitrační desky.

Další detaily týkající se zbytků vázajících se k cílovému objektu (TBMs), které zahrnují peptidy vázající se k fibrinu, jsou popsány v přihláškách U.S. Provisional Patent Application No. 60/146,425 s názvem Binding Moieties for Fibrin, identifikované jako DYX-010 a U.S. Provisional Patent Application No. 60/146,414, podaných ve stejný den (29.července 1999), ze kterých je odvozena priorita pro tuto patentovou přihlášku.

Zbytky vázající se k cílovému objektu mohou být velmi odlišné a to podle povahy cílového objektu a v závislosti na specifických požadavcích daného typu vazby. Příklady použitelných zbytků vázajících se k cílovému objektu (TBMs) zahrnují farmaceuticky účinné látky, lipofilní nebo amfifilní organické molekuly, porfyriny, receptorové ligandy, steroidy, lipidy, hormony, peptidy, oligonukleotidy (DNA, RNA nebo jejich chemicky modifikované verze), cukry nebo další biomolekuly nebo látky, o kterých je známo, že se váží s dostatečně vysokou afinitou k jedné

nebo více složkám přítomným ve specifické tkáni, která má být zobrazena. V rámci některých forem provedení vynálezu může mít jeden zbytek vázající se k cílovému objektu (TBM) vyšší afinitu k cílovému objektu než druhý zbytek vázající se k cílovému objektu (TBM) nebo než ostatní zbytky vázající se k cílovému objektu (TBMs), přičemž v tomto případě je uvedený zbytek vázající se k cílovému objektu s vyšší afinitou označen jako "primární" zbytek vázající se k cílovému objektu, zatímco všechny ostatní zbytky vázající se k cílovému objektu s nižší afinitou k cílovému objektu ve srovnání s afinitou k cílovému objektu primárního zbytku vázajícího se k cílovému objektu jsou uváděny jako "sekundární" zbytky vázající se k cílovému objektu.

Výhodné jsou takové zbytky vázající se k cílovému objektu (TBMs), které se reverzibilně váží k proteinům v plazmovém intersticiálním prostoru (tekutina mezi buňkami) nebo v intracelulárním prostoru. I když mohou být pro vazbu ke specifickému cílovému objektu použity různé biomolekuly nebo látky, jsou nejvýhodnějšími zbytky vázajícími se k cílovému objektu (TBMs) zbytky, které se váží k proteinům.

Uvedené sekundární zbytky vázající se k cílovému objektu mohou být stejné jako primární zbytky vázající se k cílovému objektu nebo mohou být odlišné od primárních zbytků vázajících se k cílovému objektu. Počet sekundárních zbytků vázajících se k cílovému objektu se může měnit od jedné do deseti, nebo jejich počet může být ještě vyšší. Přesný počet požadovaných sekundárních zbytků vázajících se k cílovému objektu bude záviset na specifičnosti zbytků vázajících se k cílovému objektu (TBMs) vůči cílovému objektu a na afinitě zbytků vázajících se k cílovému objektu (TBMs) k cílovému objektu. Dodatečné vazebné interakce poskytnuté sekundárními zbytky vázajícími se k

cílovému objektu musí být dostatečné k tomu, aby bylo dosaženo ukotvení komplexu a snížení rotačního korelačního času v každém chelátovém místě. Rezultující zvýšená relaxivita poskytuje adekvátní zlepšení kontrastu obrazu. Vazebné interakce sekundárních zbytků vázajících se k cílovému objektu a jejich afinita k cílovému objektu mohou být méně specifické než ty které jsou požadovány pro primární zbytek vázající se k cílovému objektu, poněvadž prvotní vazba primárního zbytku vázajícího se k cílovému objektu k cílovému objektu je schopna poskytnout nezbytnou specifickou uplatňující se při rozlišení cílového objektu. V některých případech může cílový objekt obsahovat dimerní vazebná místa a těchto případech se dává přednost dvěma identickým zbytkům vázajícím se k cílovému objektu.

Cíle pro kontrastní činidla popsaná v této přihlášce vynálezu jsou četné a rozmanité. Cílovým objektem může být libovolná část těla, buňky, orgánu nebo tkáně nebo jejich složka. Výhodnými cílovými objekty jsou ty cílové objekty, které se týkají diagnostických a terapeutických aplikací, t.j. ty cílové objekty, které mají spojitost s chorobnými stavy. Obzvláště výhodnými cílovými objekty jsou cílové objekty, které mají spojitost s tělními tekutinami, zejména s těmi, které jsou v souvislosti s krví, plazmou, lymfou a tekutinami centrální nervové soustavy. Dalšími výhodnými cílovými objekty jsou proteiny, které se vyskytují ve vysokých koncentracích a mají velký počet vazebných míst pro určité ligandy. Množina vazebných míst poskytuje místo kontaktu pro jednu nebo více sekundárních zbytků vázajících se k cílovému objektu. Takovými cílovými proteiny jsou enzymy a glykoproteiny.

Lešení pro připojení zbytků zlepšujících obraz (IEMs) a zbytků vázajících se k cílovému objektu (TBMs)

Vynález poskytuje také třetí složku multimerních kontrastních činidel, kterou je chemická struktura neboli "lešenářská" struktura zkráceně označována jako "lešení", ke které jsou připojeny zbytky zlepšující obraz (IEMs) a zbytky vázající se k cílovému objektu (TBMs), jak je to patrné z obr.5. Toto lešení je tvořeno chemickou strukturou nacházející se mezi dvěma nebo více zbytky vázajícími se k cílovému objektu (TBMs), ke které mohou být připojeny v různých polohách dva nebo více zbytků zlepšujících obraz (IEMs) a to buď přímo nebo prostřednictvím linkerů k vytvoření multimerních/multilokálně vazebných sloučenin. Nové sloučeniny obsahující tyto lešenářské struktury omezují lokální chelátový pohyb nekovalentní vazbou zbytků vázajících se k cílovému objektu (TBMs) k cílovému objektu v několika (alespoň dvou) separátních místech. Multimerní kontrastní činidlo se váže k cílovému objektu "pseudo-cyklickým" nebo "zipovým" způsobem, čímž se dosáhne interakce ve dvou nebo více místech. Tento typ vazby zvýší tuhost struktury multimerního kontrastního činidla, zahrnující vazebnou skupinu, lešení a individuální zbytky zlepšující obraz.

Obecně budou strukturu lešení tvořit velmi různé organické molekuly, které mohou zahrnovat jednu až deset opakujících se monomerních podjednotek. Lešení může mít buď otevřený nebo cyklický řetězec. Zbytky vázající se k cílovému objektu (TBMs) jsou kovalentně připojené k vnitřní nebo koncové části uvedené struktury. V každém případě zde musí být alespoň dvě separátní zbytky vázající se k cílovému objektu (TBMs) k ukotvení molekuly k cílovému objektu. Tyto zbytky vázající se k cílovému objektu (TBMs) mohou být buď stejné (homogenní) nebo odlišné (heterogenní). Homogenní zbytky vázající se k cílovému objektu (TBMs) mohou vykazovat buď různou nebo obdobnou vazebnou afinitu k cílovému objektu.

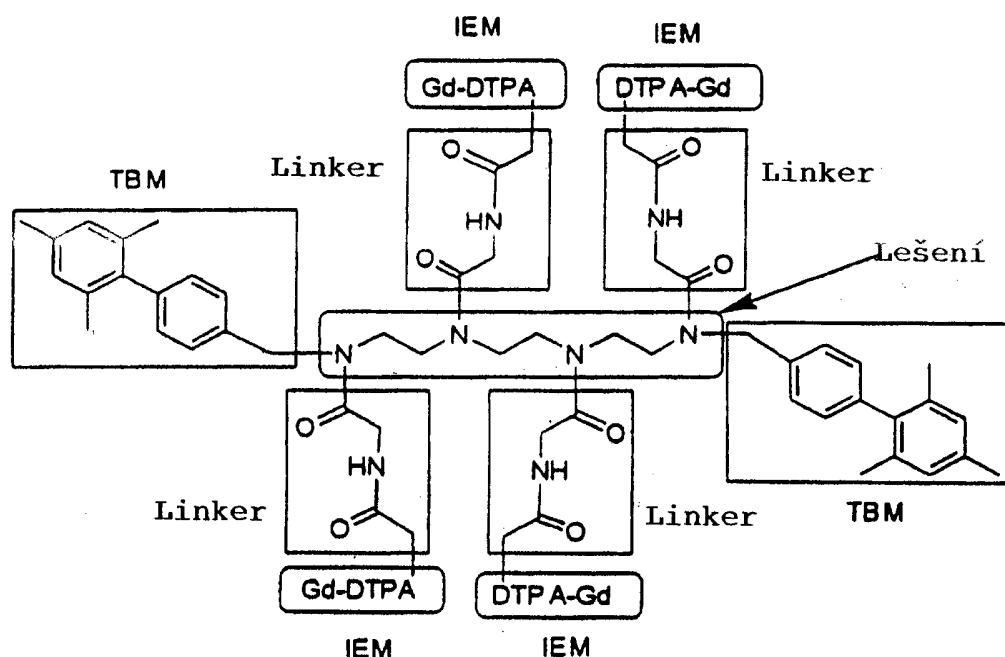
Lešení jak s otevřeným, tak i cyklickým řetězcem rovněž poskytuje nosnou strukturu pro připojení zbytků zlepšujících obraz (IEMs). Počet zbytků zlepšujících obraz (IEMs) se může pohybovat od dvou do asi dvanácti. Zbytky zlepšujících obraz (IEMs) mohou být promíchány se zbytky vázajícími se k cílovému objektu (TBMs), přičemž zbytky zlepšující obraz (IEMs) mohou být připojeny buď k vnitřní části lineární struktury lešení nebo ke koncům této struktury, případně prostřednictvím linkerů, avšak alespoň ve dvou různých polohách uvedené struktury. Zbytky zlepšující obraz mohou být stejné (homogenní) nebo různé (heterogenní). Heterogenní zbytky zlepšující obraz mohou vykazovat různou nebo obdobnou schopnost generování kontrastu.

V rámci lešení s otevřeným řetězcem může být za použití standardních technik syntetizováno mnoho typů struktur. Obzvláště výhodná jsou lešení, která mají podél své struktury pravidelně se opakující heteroatomy. Takové heteroatomy obecně umožňují snadné připojení zbytků zlepšujících obraz (IEMs) nebo zbytků vázajících se k cílovému objektu (TBMs). Obzvláště výhodnými formami jsou oligomerní alkylenaminová lešení. Tato oligomerní alkylenaminová lešení mohou být buď rozvětvená nebo lineární. To znamená, že uvedené struktury mohou mít buď lineární strukturu s pravidelně odsazenými zbytky zlepšujícími obraz (IEMs) a zbytky vázajícími se k cílovému objektu (TBMs), nebo tato chemická struktura se může větvit tak, že zbytky zlepšující obraz (IEMs) nebo/a zbytky vázající se k cílovému objektu (TBMs) mohou vycházet z jediného místa na lešení. Lešení mohou být rovněž ukončena heteroatomy, jakými jsou atom kyslíku (alkoholy) nebo atom dusíku (aminy). Obzvláště výhodná provedení lešení s otevřeným rozvětveným nebo lineárním řetězcem mají terminální alkoholové nebo terminální aminové funkce.

Obr.5 znázorňuje příklad multilokální vazby multimeru, ve kterém jsou lešení, zbytky zlepšující obraz (IEMs), zbytky vázající se k cílovému objektu (TBMs) a (případně) linkery jednoznačně vymezeny zarámováním do příslušných bloků.

Obr.5

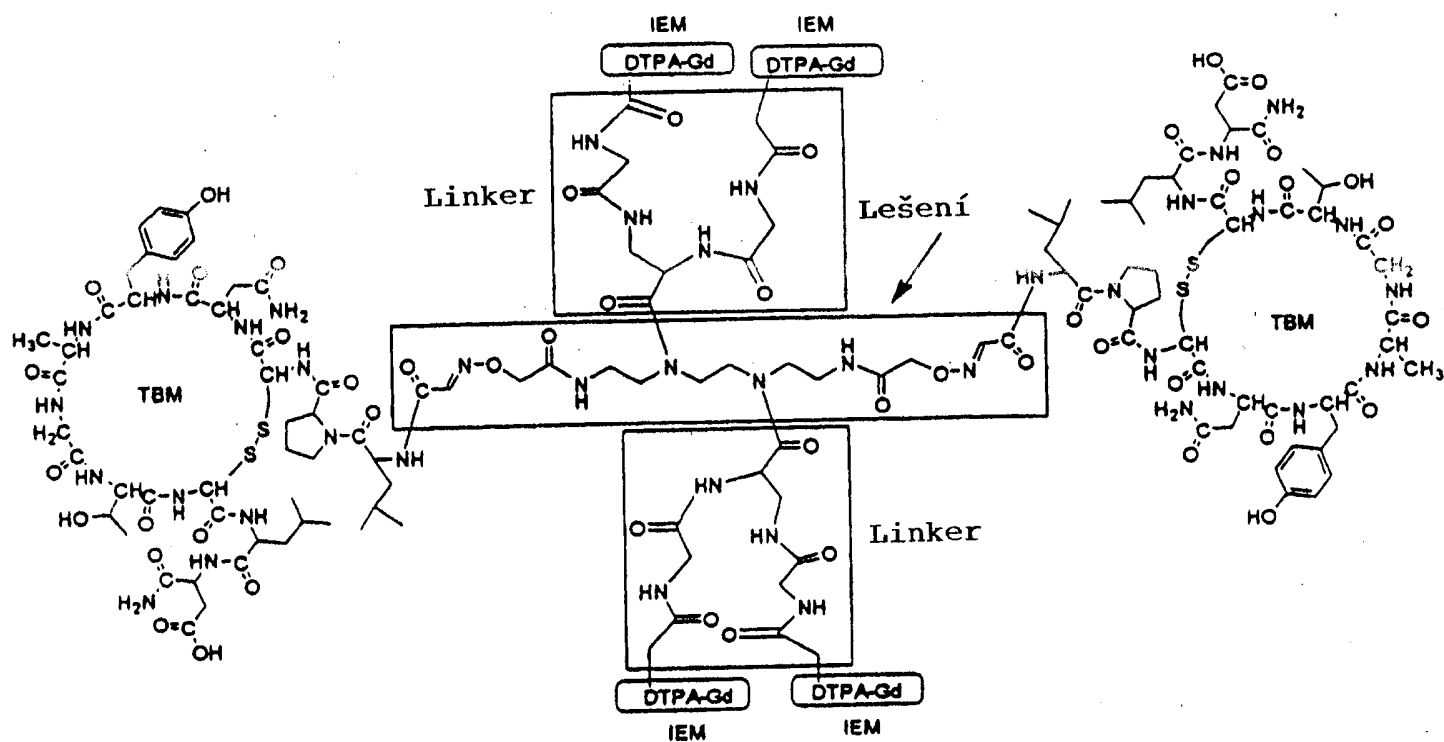
Příklad multilokálně vazebného multimeru s lineárním linkerem



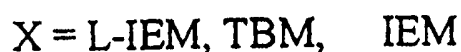
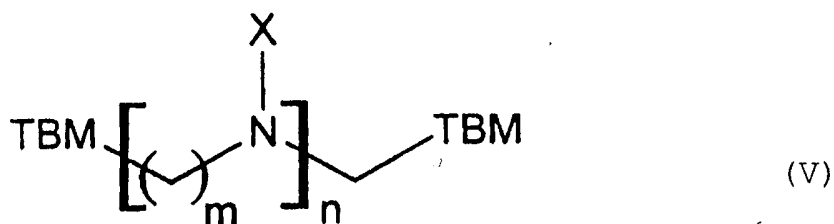
Jiný příklad multimeru s rozvětveným linkerem je znázorněn na obr.6. Rovněž v tomto případě jsou lešení, zbytky zlepšující obraz (IEMs), zbytky vázající se k cílovému objektu (TBMs) a (případně) linkery multimeru jednoznačně vyznačeny zarámováním do příslušných bloků. Na obr.6 jsou dvě jednotky vázající se k cílovému objektu tvořeny peptidy vázanými k polyaminovému lešení, přičemž tyto dvě složky mají pouze ilustrační charakter a nikterak neomezují vlastní rozsah vynálezu.

Obr.6

Příklad multilokálně vazebného multimeru s rozvětveným linkerem



Generická struktura lineárního lešení s opakující se aminovou podstrukturou má následující vzorec V



X = L-IEM, TBM nebo IEM

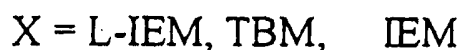
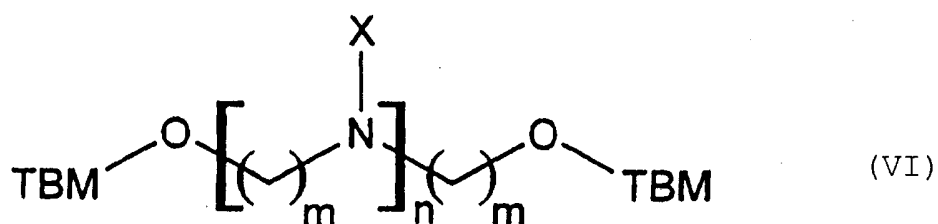
kde

m se může měnit od 1 do 10 a

n se může měnit od 2 do 10.

Výhodně m znamená 1 až 2, 2 až 4, 4 až 6, 6 až 8 nebo 8 až asi 10. Výhodně n znamená 2 až 4, 4 až 6, 6 až 8 nebo 8 až asi 10.

Generická struktura lineárního lešení s opakující se aminovou podstrukturou a koncovými atomy kyslíku, které umožňují tvorbu ethericky připojených zbytků vázajících se k cílovému objektu (TBMs), má následující obecný vzorec VI



X = L-IEM, TBM nebo IEM

kde

m se může měnit od 1 do asi 10 a

n se může měnit od 2 do 10.

Výhodně m znamená 1 až 2, 2 až 4, 4 až 6, 6 až 8 nebo 8 až asi 10. Výhodně n znamená 2 až 4, 4 až 6, 6 až 8 nebo 8 až asi 10.

Struktury lešení nejsou omezeny ani na opakující se podstruktury s aminy, ani na struktury obsahující koncové atomy kyslíku nebo koncové atomy dusíku. Lešení může obsahovat jakoukoliv opakující se podstrukturu, která umožňuje připojení zbytků zlepšujících obraz (IEMs), případně prostřednictvím linkerů, a zbytků vázajících se k cílovému objektu (TBMs). Atomy uhlíku obsažené v lešení mohou být případně substituovány nebo nahrazeny heteroatomy zvolenými z množiny zahrnující atom kyslíku, atom dusíku, atom síry, atom fosforu a atom halogenu. Uvedené lešení může rovněž obsahovat substituenty, jakými jsou například uhlovodíky s krátkým řetězcem (t.j. uhlovodíky, jejichž řetězec obsahuje 1 až 10 uhlíkových atomů. Tyto boční uhlovodíkové řetězce mohou být případně substituovány nebo nahrazeny heteroatomy zvolenými z množiny zahrnující atom kyslíku, atom dusíku, atom síry, atom fosforu a atom halogenu. Takto mohou lešení obsahovat mnoho obvyklých organických skupin, jakými jsou například fosfodiesterové skupiny, karbamátové skupiny, sulfátové skupiny a sulfonylové skupiny. Stejně tak substituenty, které jsou vázány ke struktuře lešení, mohou rovněž obsahovat mnoho obvyklých organických skupin, jakými jsou například fosfodiesterové skupiny, karbamátové skupiny, sulfátové skupiny, sulfonylové skupiny a aminokyselinové skupiny.

Obr.7 ukazuje některé ilustrativní příklady lineárních a rozvětvených polyaminových lešení společně s odpovídajícími příklady kontrastních činidel obsahujících tato lešení.

Dále zařazený obr.8 uvádí příklady oligomerních lešení společně s odpovídajícími příklady kontrastních činidel obsahujících tato lešení.

Lešení obsahující heteroatomy představují výhodnou formu provedení vynálezu vzhledem k tomu, že tyto heteroatomy umožňují snadné připojení zbytků zlepšujících obraz (IEMs) a zbytků vázajících se k cílovému objektu (TBMs), případně prostřednictvím linkerů.

Obr.7

## Příklady lineárních a rozvětvených polyaminových lešení

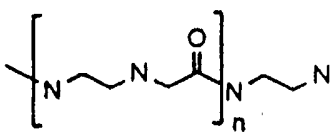
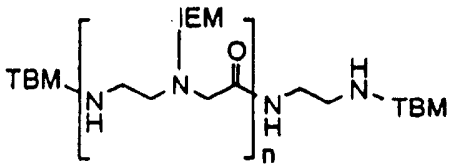
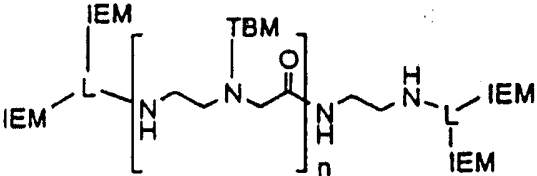
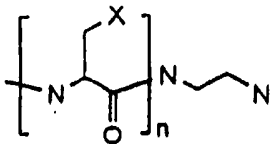
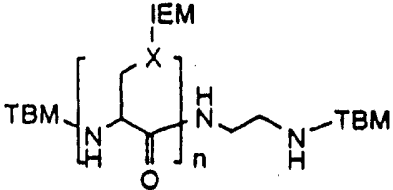
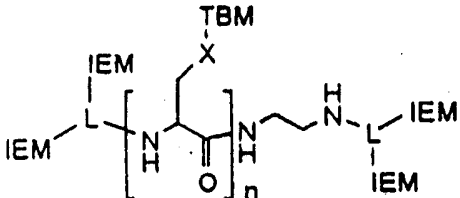
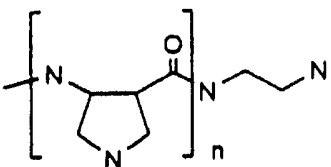
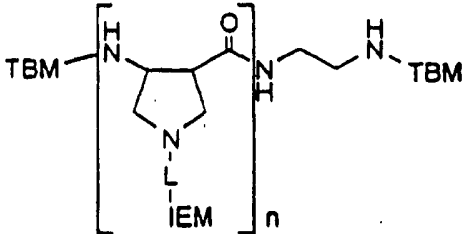
| Příklady řešení | Odpovídající multimerní kontrastní činidla |
|-----------------|--------------------------------------------|
|                 |                                            |
|                 |                                            |
|                 |                                            |
|                 |                                            |
|                 |                                            |
|                 |                                            |

$X = N, O, S$

**L = Linker**

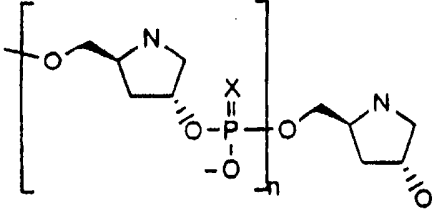
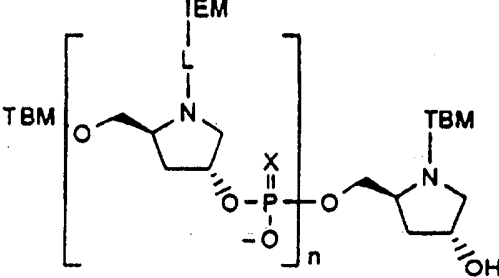
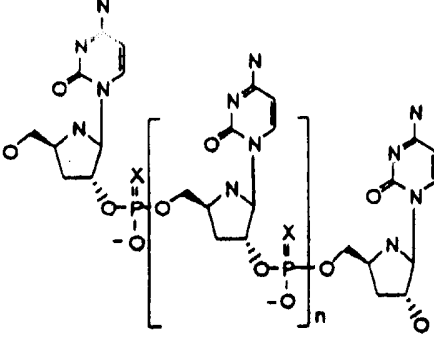
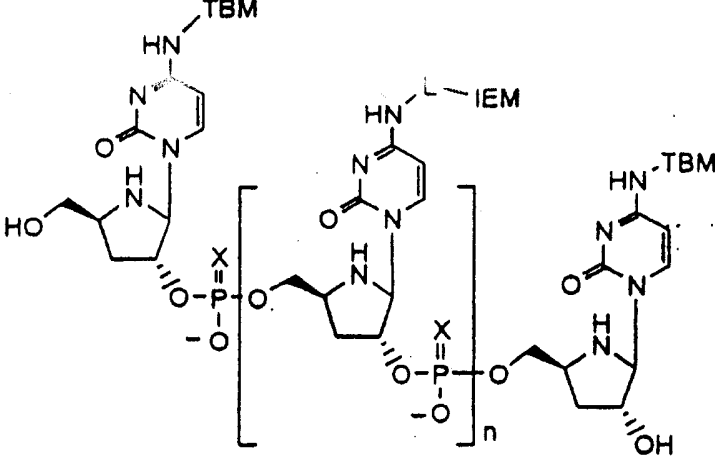
Obr.8

Příklady oligomerních lešení

| Příklady lešení                                                                     | Odpovídající multimerní kontrastní činidla                                           |
|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
|    |    |
|                                                                                     |    |
|  |  |
|                                                                                     |  |
|  |  |

X = N, O, S

L = Linker

| Příklady lešení                                                                     | Odpovídající multimerní kontrastní činidla                                          |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
|    |   |
|  |  |

X = N, O, S

L = Linker

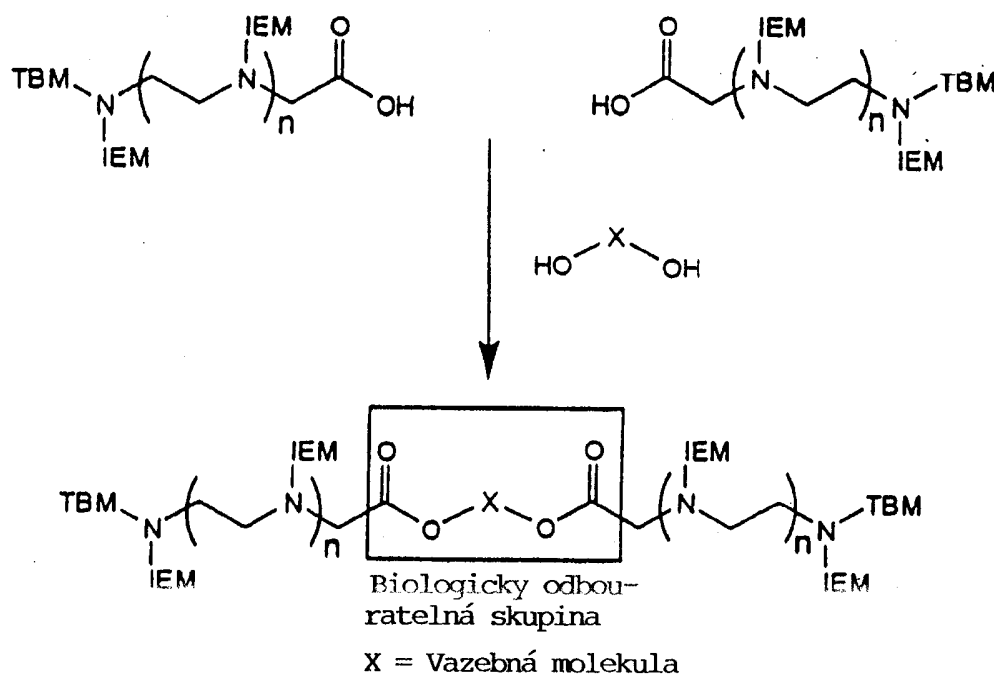
Další výhodná forma provedení lešení podle vynálezu zahrnuje lešení, jehož základní řetězec je snadno odbouratelný in vivo. Biodegradovatelná kontrastní činidla mají strukturu lešení, která může být odbourána například působením enzymů, které se vyskytují v těle savců. Výhodně takové lešení obsahuje jednu nebo více biologicky odbouratelných skupin, které mohou být specificky odbourány enzymem. Obzvláště výhodnými biologicky odbouratelnými

lešeními jsou lešení, která mohou být odbourána lidskými enzymy. Vzhledem k tomu, že je známo velké množství enzymatických aktivit, může být přesná struktura uvedených biologicky degradovatelských skupin velmi proměnlivá. Obzvláště výhodné formy provedení uvedených biologicky odbouratelných skupin představují neomezujícím způsobem karbonylové skupiny, esterové skupiny, diesterové skupiny, fosfátové skupiny, difosfátové skupiny, fosfodiesterové skupiny, anhydridové skupiny, sulfonylové skupiny, sulfátové skupiny a karbamátové skupiny. Taková biologicky odbouratelná lešení umožňují rychlý metabolismus multimerního kontrastního činidla a snížené riziko toxicity

Příklad biologicky odbouratelného lešení určeného pro multimer je znázorněn na obr.9. V tomto případě je lešení tvořeno kondenzací dvou karboxylových kyselin v přítomnosti molekuly obsahující dvě koncové alkoholické skupiny. Specifické reakční podmínky, při kterých se uvedená kondenzace provádí, jsou velmi dobře známe pro odborníka v daném oboru.

Obr.9

Příklad biologicky degradovatelného lešení



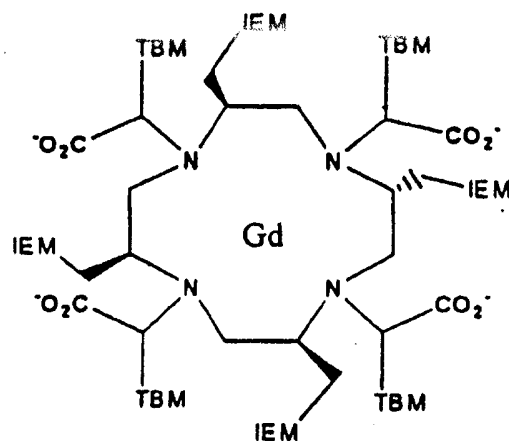
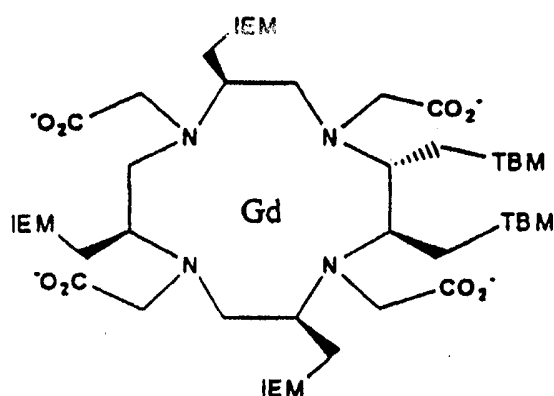
Alternativně se biologicky odbouratelná skupina může štěpit při změně hodnoty pH nebo při změně teploty anebo při aplikaci ultrazvuku nebo světla. Takové skupiny jsou velmi dobře známy v literatuře týkající se prekursorů farmaceuticky účinných látek [Kratz F., Beyer U. a Schutte M.T., Crit.Rev.Ther.Drug Carrier Syst. 16: str.245-88 (1999); Dougherty T.J., Gomer C.J., Henderson B.W., Jori G., Kessel D., Korbelik M. Moan J a Peng Q, J.Natl.Cancer Inst.90: str. 889-905 (1998); Wang W., Jiang J., Ballard C.E. a Wang B., Curr.Pharm.Des. 5: str. 265-87 (1999)].

Lešení, která obsahují cyklické členy chelatizující kovové ionty představují další výhodnou formu lešení podle vynálezu. Výhodnější jsou lešení obsahující zbytky zlepšující obraz (IEMs) a chelatizující gadolinium nebo

zajišťující chelatizaci gadolinia v lešení, jakož i v separátních zbytcích zlepšujících obraz (IEMs), které jsou připojeny k lešení. Příklady takových lešení jsou znázorněny na obr.10.

Obr.10

Příklady multimerů využívajících část gadoliniových komplexů jako lešení



Klasifikace lešení na skupiny s otevřeným řetězcem a na cyklické skupiny neznamena oddělené použití těchto skupin. Předpokládá se takto použití velkého počtu lešení s otevřeným řetězcem, který zahrnuje cyklické členy bránící pohybu molekuly. Cyklická část lešení může být tvořena

homocyklickým nebo heterocyklickým kruhem nebo homocyklickými nebo heterocyklickými kruhy. Takto mohou být tyto kruhy značně stéricky bráněnými kruhy, jako je tomu například v případě cyklopropylového kruhu, nebo mohou být méně konformačně bráněnými kruhy, jako je tomu v případě cyklohexylového kruhu.

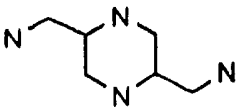
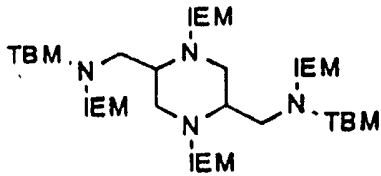
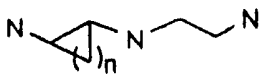
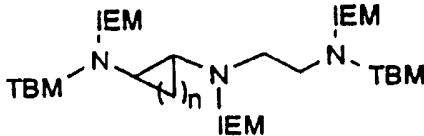
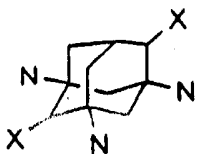
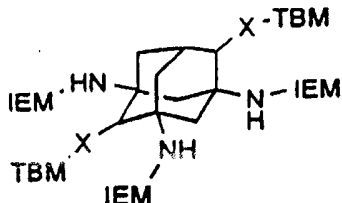
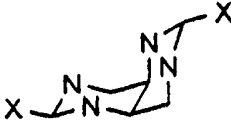
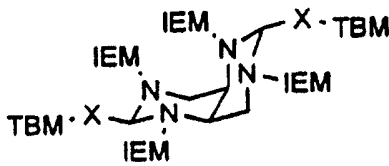
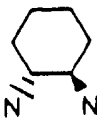
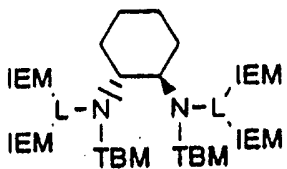
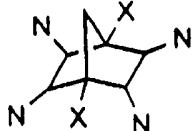
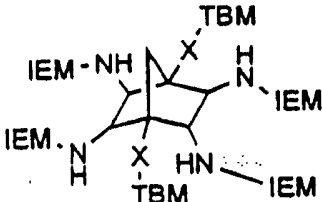
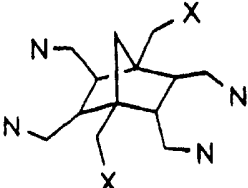
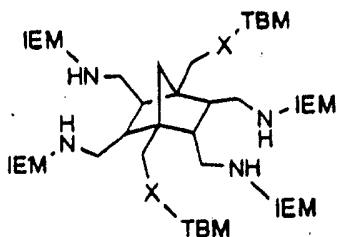
Jak části s otevřeným řetězcem, tak i cyklické části lešení mohou být případně substituované nebo nahrazené heteroatomy zvolenými z množiny zahrnující atom kyslíku, atom dusíku, atom síry, atom fosforu a atom halogenu. Lešení může rovněž obsahovat substituenty tvořené například krátkými uhlovodíkovými řetězci (tyto krátké uhlovodíkové řetězce mohou obsahovat 1 až 10 uhlíkových atomů). Takové boční uhlovodíkové řetězce mohou být případně substituovány nebo nahrazeny heteroatomy zvolenými z množiny zahrnující atom kyslíku, atom dusíku, atom síry, atom fosforu a atom halogenu. Takto mohou lešení obsahovat obvyklé organické skupiny jak v části lešení s otevřeným řetězcem, tak i v cyklické části lešení. Příklady takových organických skupin neomezujícím způsobem zahrnují karbonylové skupiny, esterové skupiny, diesterové skupiny, fosfátové skupiny, fosfodiesterové skupiny, anhydridové skupiny, sulfonylové skupiny, sulfátové skupiny a karbamátové skupiny.

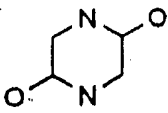
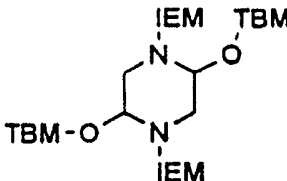
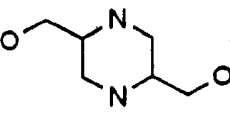
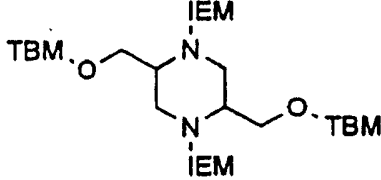
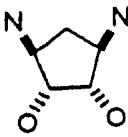
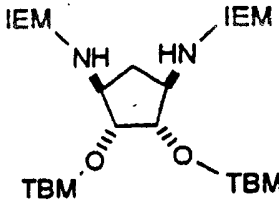
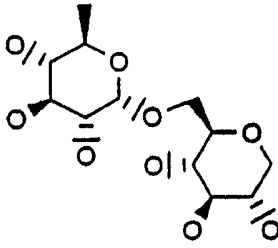
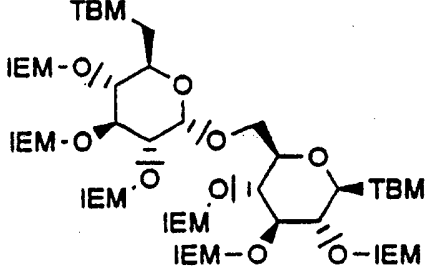
Uvedené kruhy mohou rovněž zahrnovat deriváty obecných biologických cyklických sloučenin, jakými jsou například cukry. Výhodná provedení cyklických členů zahrnují násobné kruhové systémy, jakými jsou například heterocyklické deriváty dekalinu. Další příklady neomezujícím zahrnují karbocyklické kruhy obsahující 3 až 7 atomů, ve kterých jsou až 4 atomy případně substituovány zbytky zvolenými z množiny zahrnující O, S, C(O), S(O), S(O)<sub>2</sub> a NH. Tyto kruhy jsou případně substituovány methylovými skupinami a jejich

deriváty, alkylovými, alkenylovými nebo alkinylovými skupinami obsahujícími 2 až 100 uhlíkových atomů, přičemž až 10 uhlíkových atomů je případně substituováno heteroatomy zvolenými z množiny, zahrnující atom kyslíku, atom dusíku, atom síry, atom fosforu a atom halogenu, nebo nahrazeno zbytky zvolenými z množiny, zahrnující O, S, C(O), S(O), S(O)<sub>2</sub> a NH. Právě některá lešení, jako například lešení na bázi aminokyselin, mohou obsahovat zbytky vázající se k cílovému objektu (TBMs), přičemž tato lešení mohou stejně tak obsahovat zbytky zlepšující obraz (IEMs). Zbytky zlepšujícími obraz (IEMs) může být libovolná organická molekula, kovový ion nebo chelát. Výhodnými provedeními jsou provedení s cyklickými zbytky zlepšujícími obraz (IEMs), přičemž ještě výhodnější jsou cyklické zbytky zlepšující obraz (IEMs), které jsou kovovými cheláty. Specifické příklady takových výše popsaných lineárních a cyklických kombinovaných lešení jsou uvedeny na obr.11 společně s odpovídajícími příklady kontrastních činidel obsahujících tato lešení.

Obr.11

Příklady lešení s cyklickými členy

| Příklady lešení-Polyaminy                                                           | Odpovídající multimerní kontr-činitla                                                |
|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
|    |    |
|    |    |
|   |   |
|  |  |
|  |  |
|  |  |
|  |  |

| Příklady lešení - Polyaminoalkoholové nebo etherové deriváty                        | Odpovídající multimerní kontrastní činidla                                           |
|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
|    |    |
|    |    |
|  |  |
| Příklady lešení - cukerné deriváty                                                  | Odpovídající multimerní kontrastní činidla                                           |
|  |  |

$X = N, O, S, CH_2$

$n = 1-8$

## Případné linkery

Některá provedení kontrastních činidel podle vynálezu jsou charakterizována případnou přítomností linkeru, prostřednictvím kterého jsou zbytky zlepšující obraz vázány k lešení. Zbytky zlepšující obraz (IEMs) a zbytky vázající se k cílovému objektu (TBMs) již byly popsány v předcházejícím textu. Linkerový zbytek (L) může být tvořen malou podjednotkou obsahující 1 až 30 uhlíkových atomů kovalentně vázaných jednoduchou nebo násobnou vazbou, přičemž až 10 z těchto uhlíkových atomů může být substituováno atomem kyslíku, atomem dusíku, atomem fosforu, atomem fluoru, atomem chloru, atomem bromu, atomem vodíku nebo atomem jodu. Funkcí linkeru je zprostředkovat spojení zbytků zlepšujících obraz (IEMs) s lešením. Příklady takových linkerů zahrnují lineární nebo rozvětvené alkany, alkeny nebo alky, které jsou případně substituované funkčními skupinami, jakými jsou například karbonylová skupina, etherová skupina, amidová skupina, aminová skupina, močovinová skupina, thioetherová skupina, arylová skupina, fosfátová skupina a sulfonamidová skupina. Výhodnými linkery některých forem provedení jsou tvořeny dvěma nebo více funkčními skupinami, z nichž jedna je připojena k lešení a ostatní jsou připojené ke zbytkům zlepšujícím obraz (IEMs).

Uvedené funkční chemické skupiny mohou být stejné nebo odlišné. Příklady takových funkčních skupin neomezujícím způsobem zahrnují ketonové skupiny, esterové skupiny, amidové skupiny, etherové skupiny, karbonátové skupiny, sulfonamidové skupiny, alkanové skupiny, alkenové skupiny, alkinové skupiny a karbamátové skupiny. Příklady některých reakčních činidel pro použití při přípravě linkerů jsou aminokyseliny, zejména glycin, alanin, serin, homoserin,

threonin, tyrosin, cystein, aminofenylalanin, lysin, ornithin, kyselina 2,4-diaminomásečná, kyselina diaminopropionová, hydroxyprolin, kyselina asparagová a kyselina glutamová, dioly, zejména ethylenglykol, dihalogenidy, zejména ethylendichlorid, 2-merkapt ethanol, 2-aminoethanol, 1,2-diaminoethanol, dikarboxylové kyseliny, zejména kyselina oxalová, kyselina malonová, kyselina jablečná, kyselina jantarová, kyselina fumarová, kyselina glutarová a kyselina adipová, a další malé bifunkční, trifunkční a multifunkční molekuly.

Ještě dalšími linkery mohou neomezujícím způsobem být močovinové, acetálové, ketalové, dvojně esterové, karbonylové, thiomočovinové, sulfonové, thioesterové, esterové, etherové, disulfidové, laktonové, iminové, fosforylové nebo fosfodiesterové vazebné členy; substituované nebo nesubstituované, nasycené nebo nenasyčené alkylové řetězce, lineární, rozvětvené nebo cyklické aminokyselinové řetězce jediné aminokyseliny nebo různých aminokyselin (například nastavení N- nebo C-konce fibrinového vazebného zbytku); kyselina malonová, kyselina jantarová, kyselina glutarová, kyselina adipová a kyselina pimelová; kyselina kapronová, jednoduché diaminy a dialkoholy.

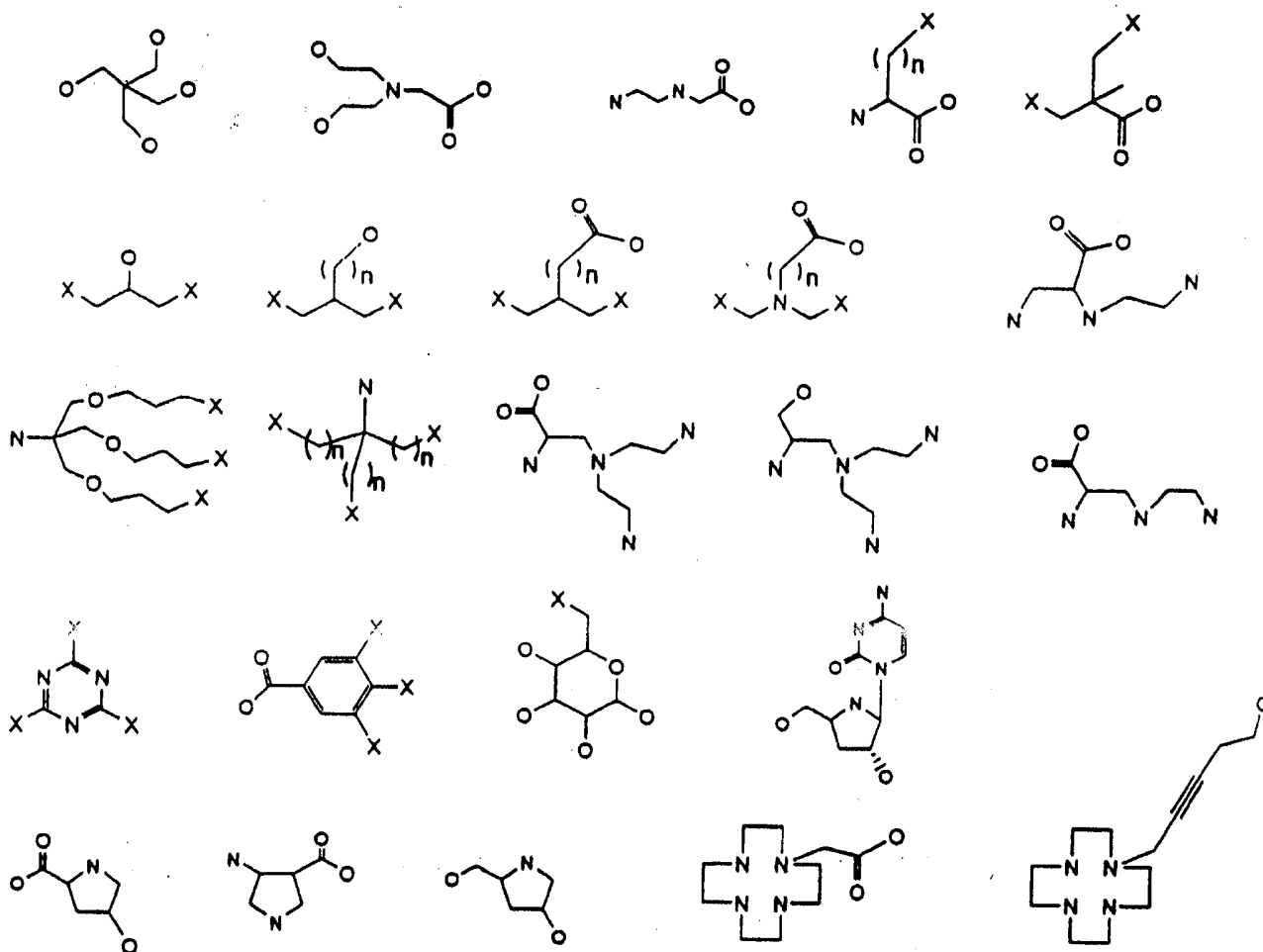
Výhodná je dobře definovaná molekulová hmotnost linkeru. Tyto molekulové hmotnosti se mohou pohybovat v rozmezí od méně než 100 do více než 1000. Výhodně je molekulová hmotnost linkeru nižší než 200 a dokonce ještě výhodněji nižší než 100. Kromě toho může být žádoucí použít linker, který je biologicky odbouratelný in vivo za účelem poskytnutí účinného způsobu vyloučení zobrazovacích činidel podle vynálezu z těla. Podle jejich umístění v linkeru mohou takové biologicky odbouratelné funkce zahrnovat

esterovou, diesterovou, amidovou, fosfoesterovou, etherovou, acetalovou a ketalovou funkci.

K připojení kovového chelátu nebo jiných zbytků zlepšujících obraz (IEMs) k linkeru a linkeru ke zbytku vázajícímu se k cílovému objektu (TBM) mohou být obecně použity o sobě známé metody. Viz například metody popsané v patentových dokumentech WO 95/28967, WO 98/18496 a WO 98/18497. Vynález předpokládá připojení chelátu v libovolné poloze za předpokladu, že si kovový chelát zachová schopnost pevně vázat kov, což je nezbytné pro omezení toxicity kontrastního činidla na pokud možno co nejmenší míru. Příklady některých linkerů jsou uvedeny na obr.12, přičemž ve strukturách zobrazených linkerů jsou pro zjednodušení vypuštěny atomy vodíku.

Obr. 12

Příklady linkerů s množinou vazebných míst



X = N, O, S

Zlepšení kontrastu ve spojitosti s multilokálně vazebnými interakcemi

Vynález v rámci svých různých provedení zlepšuje střední relaxivitu všech paramagnetických kovových, například gadoliniových, center v cílené vázané multimerní chelátové struktuře. Příklady uvedené v tabulce 1 a v tabulce 2 demonstrují, že cílená vazba multiplové struktury

zbytků zlepšujících obraz (IEMs) realizovaná prostřednictvím jediného samotného zbytku vázajícího se k cílovému objektu je nepostačující pro zlepšení střední vázané relaxivity, vztažené na Gd(III), takovou měrou, jak je to pozorováno u srovnatelné struktury obsahující jeden zbytek zlepšující obraz (IEM). O když vazba zprostředkovaná jediným zbytkem vázajícím se k cílovému objektu (TBM) zkracuje celkový rotační korelační čas multimeru, mají individuální, kovové, například gadoliniové cheláty zjevně ještě dostatek volnosti k tomu, aby rotovaly dosti nebráněným způsobem. Tento nadměrný pohyb snižuje relaxivitu každého kovového centra. Je překvapivou skutečností, že to platí dokonce i v případě, kdy multimer obsahuje zbytek vázající se k cílovému objektu (TBM) se dvěma aromatickými kruhy. V mezinárodní přihlášce PCT WO 96/23526 se uvádí, že k albuminu vázaná relaxivita kontrastních činidel s jediným zbytkem zlepšujícím obraz (IEM) se zlepší použitím vazebného zbytku plazmového proteinu (PPBM, Plasma Protein Binding Moiety) obsahujícího dva nebo více aromatických kruhů v neplanární orientaci. Jak je to ilustrováno v tabulce 1, poskytuje použití takové zbytku vázajícího se k cílovému objektu (TBM) (difenylcyklohexylový zbytek) znamenité zlepšení relaxivity pro jediný zbytek zlepšující obraz (IEM) (MS-325), avšak překvapivě nízkou k albuminu vázanou relaxivitu, vztaženou na jeden zbytek zlepšující obraz, pro multimerové analogy. Za účelem dalšího zlepšení relaxivity cílených multimerů musí být redukován lokální pohyb chelatizujících skupin a chelátového iontu.

Vynález popisuje cílené multimery, které vykazují vysokou relaxivitu v důsledku multilokálně vazebných interakcí a doprovodného snížení flexibility. Bylo zjištěno, že zavedení dvou nebo více zbytků vázajících se k cílovému objektu (TBMs) lokalizovaných tak, že zde

nedochází k významnějšímu snížení relaxivity, vztažené na jeden zbytek zlepšující obraz (IEM), po vázání k cílovému objektu, pozoruhodným způsobem zlepšuje relaxivitu, takže v mnoha případech je relaxivita, vztažená je jeden zbytek zlepšující obraz, pro kontrastní činidlo ve vázaném stavu shodná s relaxivitou, která byla dříve pozorována pro jediný zbytek zlepšující obraz (7- až 8-násobné zlepšení). Zlepšení relaxivity, vztažené na jeden zbytek zlepšující obraz (IEM), je důsledkem snížené flexibility multimerní struktury vázané k cílovému objektu, včetně připojených jednotek zlepšujících obraz (IEMs). Zvýšení relaxivity po vázání k cílovému objektu je typicky 1,5-násobné nebo ještě vyšší. K výhodné rozlišovací schopnosti obrazu dochází při alespoň 2- až 3-násobném zvýšení relaxivity. Výhodnější je 4-násobné, 5-násobné a 6-násobné zvýšení relaxivity. Ještě výhodnější je 7- až 8-násobné, 9- až 10-násobné nebo vyšší než 10-násobné zvýšení relaxivity. Výhodná relaxivita, vztažená na jeden zbytek zlepšující obraz (IEM), při 20 MHz a teplotě 37 °C činí alespoň  $15 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ , výhodněji alespoň  $20 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ , výhodněji alespoň  $25 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ , výhodněji  $30 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ , ještě výhodněji alespoň  $35 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  a nejvýhodněji  $40 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Výhodně je relaxivita kontrastního činidla jako celku vyšší než  $60 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  při 20 MHz a teplotě 37 °C.

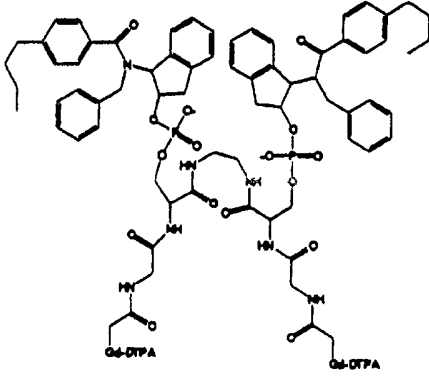
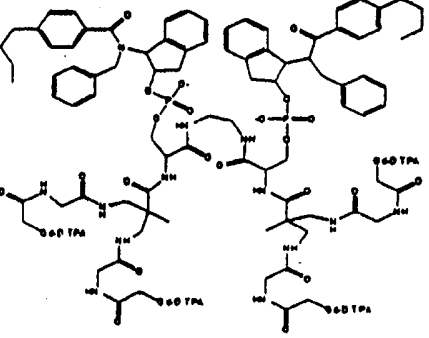
Následující údaje slouží k ilustraci zlepšení kontrastu, které je důsledkem multilokální vazby kontrastního činidla k cílovému objektu. Zlepšení vyplývající z přítomnosti množiny zbytků vázajících se k cílovému objektu (TBMs) je zřejmé ze tří specifických srovnání uvedených v tabulce 2. V této tabulce obsahují sloučeniny podle vynálezu alespoň dva zbytky zlepšující obraz (IEMs) a alespoň dva zbytky vázající se k cílovému objektu (TBMs). Tyto sloučeniny podle vynálezu jsou zde srovnány se sloučeninami, které mají pouze jediný zbytek zlepšující obraz (IEM) nebo jediný zbytek vázající se k

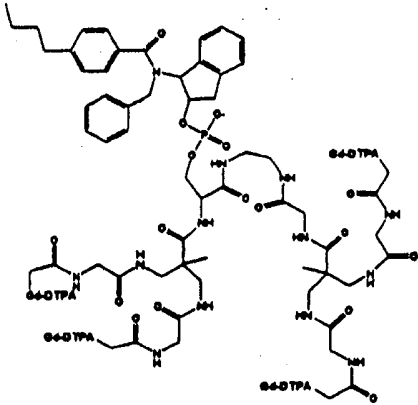
cílovému objektu (TBM). Toto srovnání demonstruje zvýšenou relaxivitu sloučenin podle vynálezu vztaženou na jeden zbytek zlepšující obraz. Pro měření, jejichž výsledky jsou uvedeny v tabulce, byl jako cílový objekt použit lidský sérový albumin (HSA). Srovnání molekul M8-04 a M8-05 především demonstruje, že při zvyšování počtu zbytků zlepšujících obraz (IEMs) při zachování konstantního počtu zbytků vázajících se k cílovému objektu (TBMs) má za následek odpovídající zvýšení celkové relaxivity. Specificky toto srovnání demonstruje, že zbytky zlepšující obraz (IEMs) mohou být přidány bez přiměřeného zmenšení relaxivity, vztažené na Gd(III)-ion, pouze za předpokladu, že v molekule jsou přítomné alespoň dva adekvátně odsazené zbytky vázající se k cílovému objektu.

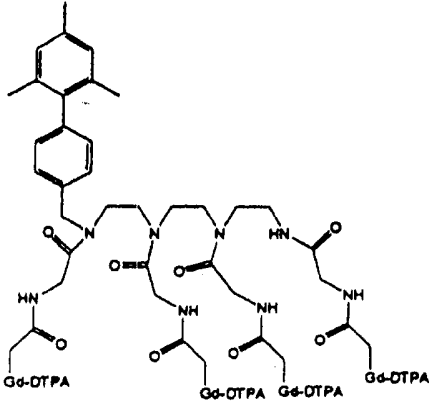
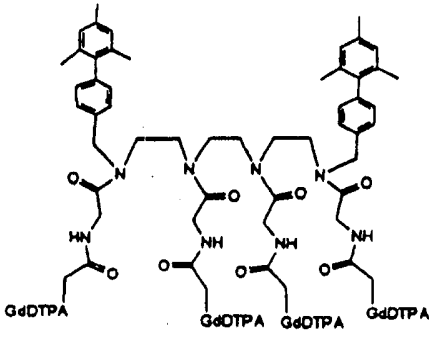
Jak sloučenina M8-04, tak i sloučenina M8-05 obsahují dva zbytky vázající se k cílovému objektu (TBMs), přičemž každá z těchto sloučenin obsahuje k benzenovému jádru kondenzovanou cyklopentylovou skupinu, fenylovou skupinu a fenylovou skupinu substituovanou alkylovou skupinou. Tyto dva zbytky vázající se k cílovému objektu (TBMs) zjevně postačují k takovému ukotvení molekuly kontrastního činidla, že když se počet zbytků zlepšujících obraz (IEMs) (v tomto případě jde o zbytky DTPA) zvýší ze dvou na čtyři, zůstane relaxivita, vztažená na jeden Gd(III)-ion, na každém místě zbytku zlepšujícího obraz stejná (32 oproti 32,7  $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  při 20 MHz). Zdvojnásobení celkové relaxivity molekuly je takto v souladu se zdvojnásobením počtu zbytků zlepšujících obraz (IEMs) 64  $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  pro dva zbytky zlepšující obraz (IEMs) proti 131  $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  pro čtyři zbytky zlepšující obraz (IRMs).

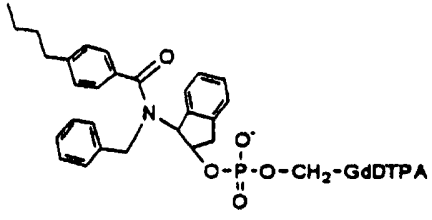
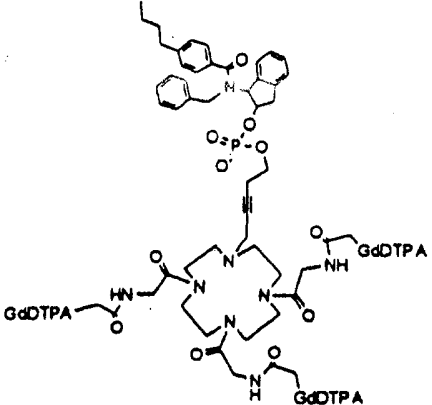
Tabulka 2

Zvýšení relaxivity dosažené multilokální vazbou: jediný zbytek vázající se k cílovému objektu (TBM) proti dvěma zbytkům vázajícím se k cílovému objektu (TBMs)

| Sloučenina | Počet TBMs | Počet IEMs | Chemická struktura                                                                  | Vázáno (%) | R1váz./Gd <sup>3+</sup> mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> (20MHz) | Čelk.R1váz. mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> (20MHz) |
|------------|------------|------------|-------------------------------------------------------------------------------------|------------|------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| M8-04      | 102        | 2          |   | 99         | 32                                                               | 64                                                   |
| M8-05      | 2          | 4          |  | 97         | 32.7                                                             | 131                                                  |

|       |   |   |                                                                                   |      |    |     |
|-------|---|---|-----------------------------------------------------------------------------------|------|----|-----|
| M8-06 | 1 | 4 |  | 91.3 | 27 | 108 |
|-------|---|---|-----------------------------------------------------------------------------------|------|----|-----|

|       |   |   |                                                                                     |      |      |       |
|-------|---|---|-------------------------------------------------------------------------------------|------|------|-------|
| M8-07 | 1 | 4 |    | 64.1 | 16   | 64    |
| M8-08 | 2 | 4 |  | 93.7 | 44.1 | 176.5 |

|       |   |   |                                                                                    |      |      |      |
|-------|---|---|------------------------------------------------------------------------------------|------|------|------|
| M8-09 | 1 | 1 |   | 99.5 | 38.7 | 38.7 |
| M8-10 | 1 | 3 |  | 66.1 | 25.7 | 77.1 |

Srovnání molekul M8-06 a M8-05 také demonstruje, že zvýšení počtu zbytků vázajících se k cílovému objektu (TBNS) při zachování konstantního počtu zbytků zlepšujících obraz (IEMs) má za následek zvýšení relaxivity, vztažené na jeden zbytek zlepšující obraz, pouze v případě, kdy jsou zbytky vázající se k cílovému objektu adekvátně odsazené. V obou uvedených molekulách mají zbytky vázající se k cílovému objektu (TBMs) stejnou strukturu a struktura zbytku zlepšujícího obraz (IEM) je tvořena stejným gadoliniem chelátovaným DTPA-zbytkem. Sloučenina M8-06 však obsahuje pouze jeden zbytek vázající se k cílovému objektu (TBM), zatímco sloučenina MB-05 obsahuje dva zbytky vázající se k cílovému objektu (TBMs). Dva zbytky vázající se k cílovému objektu (TBMs) ve sloučenině M8-05 účinněji ukotvují molekulu této sloučeniny, což je patrné z toho, že relaxivita, vztažená na jeden Gd(III)-ion, vzroste z  $27,0 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  na  $32,7 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  při 20 MHz. Zvýšení počtu zbytků vázajících se k cílovému objektu (TBMs) takto zvyšuje relaxivitu, vztaženou na jeden zbytek zlepšující obraz (IEM) pouze za předpokladu, že zbytky vázající se k cílovému objektu jsou adekvátně odsazené.

Srovnání molekul M8-07 a M8-08 (viz tabulka 2) konečně znovu demonstruje, že zvýšení počtu adekvátně odsazených zbytků vázajících se k cílovému objektu (TBMs) při zachování konstantního počtu jednotek zlepšujících obraz (IEMs) má za následek zvýšení relaxivity, vztažené na jeden zbytek zlepšující obraz (IEM). V obou molekulách mají zbytky vázající se k cílovému objektu (TBMs) stejnou alkylem substituovanou bifenylovou strukturu a obě sloučeniny mají stejný počet zbytků zlepšujících obraz (IEMs), přičemž struktura zbytku zlepšujícího obraz je tvořena stejným gadolinium-DTPA-zbytkem. Jádrové struktury (lešení) jsou rovněž shodnými tetraaminy u obou molekul M8-07 a M8-08. Sloučenina M8-07 obsahuje jediný zbytek

vázající se k cílovému objektu (TBM) a čtyři zbytky zlepšující obraz (IEMs), zatímco sloučenina M8-07 obsahuje dva zbytky vázající se k cílovému objektu (TBMs) a čtyři zbytky zlepšující obraz (IEMs). Rovněž v tomto případě dva zbytky vázající se k cílovému objektu (TBMs) ve sloučenině M8-08 účinněji ukotvují molekulu kontrastního činidla, v důsledku čehož vzroste vázaná relaxivita, vztažená na Gd(III)-ion, z  $16,0 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  na  $44,1 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  při 20 MHz v přítomnosti lidského sérového albuminu. Výpočet takto ukazuje, že více než dvojnásobné zvýšení relaxivity uvedené molekuly je v souladu se zdvojnásobením počtu zbytků vázajících se k cílovému objektu (TBMs) (2,75-násobné zvýšení z  $64,0 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  pro jeden zbytek vázající se k cílovému objektu (TBM) na  $176,5 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  pro dva zbytky vázající se k cílovému objektu (TBMs)). Na druhé straně jsou volné (nevázané) relaxivity sloučenin M8-07 a M8-08 srovnatelné ( $9,2$  resp.  $10,3 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  při 20 MHz). Poměry  $R1_{\text{vázaná}}/R1_{\text{volná}}$  pro sloučeniny M8-07 a M8-08 jsou rovné  $1,7$  resp.  $4,3$ , což ukazuje, že sloučenina M8-08 poskytuje lepší zlepšení kontrastu mezi cílovým objektem a pozadím. Poněvadž sloučenina M8-08 má rovněž zvýšenou afinitu k lidskému sérovému albuminu a tudíž větší specifickou vůči cílovému objektu ve srovnání se sloučeninou M8-07, mělo by být zlepšení kontrastu poskytnuté multilokálně vazebným multimerem dokonce ještě výraznější ve srovnání s multimerem obsahujícím pouze jeden zbytek vázající se k cílovému objektu (TBM).

Konečně uvedená tabulka rovněž zahrnuje údaje týkající se sloučenin M8-09 a M8-10. Tyto údaje jsou zde uvedeny s cílem ilustrovat typické relaxivity molekul, které obsahují jediný zbytek vázající se k cílovému objektu (TBM) a množinu zbytků zlepšujících obraz (IEMs). Srovnání molekul M8-09 a M8-10 rovněž demonstruje, že pouhé přidání zbytků zlepšujících obraz (IEMs) k molekule s určitým zbytkem

vázajícím se k cílovému objektu (TBM) nemá za následek úměrné zvýšení celkové relaxivity, protože trojnásobné zvýšení počtu zbytků zlepšujících obraz má za následek pouze dvojnásobné zvýšení relaxivity.

Ukotvení molekuly kontrastního činidla ve dvou separátních místech slouží takto ke zvýšení relaxivity (t.j. ke zkrácení rotačního korelačního času) obou molekul jako celku a pro lokální chelátové oblasti v kontrastním činidlu. Zbytky vázající se k cílovému objektu (TBMs) by měly být od sebe odděleny dostatečnou vzdáleností, avšak tak, aby ještě účinně snižovaly flexibilitu celé molekuly v případě, že je tato molekula vázána k cílovému objektu. To má za následek, že hodnoty střední relaxivity  $RI_{\text{vázaná}}$  vztažené na jeden zbytek zlepšující obraz (IEM), v podstatě nepoklesnou po přidání až čtyř zbytků zlepšujících obraz (IEMs). Multilokální vazba překvapivě omezuje flexibilitu celé multimerní chelátové struktury. V případě zbytků zlepšujících obraz (IEMs) zahrnujících cheláty takto dochází po vázání molekuly kontrastního činidla k cílovému objektu k omezení lokálního chelátového pohybu. V důsledku toho lze pozorovat pozoruhodným způsobem zlepšení signály magneticko-rezonančního zobrazení ve srovnání se zlepšením dosaženým u analogických multimerních chelátových sloučenin, které jsou k cílovému objektu vázány pouze prostřednictvím jediného zbytku vázajícího se k cílovému objektu (TBM) a které nejsou tudíž vázány k zacíleným místům "pseudo-cyklickým" nebo "zipovým" způsobem. Zlepšení kontrastu je těmito multimerními multilokálně vazebnými strukturami ještě dále zlepšeno vzhledem tomu, že tyto struktury produkují signál v nevázaném stavu, který je slabší než u kontrastních činidel, která mají i v nevázaném stavu tuhou molekulární strukturu, a mají zlepšenou vazebnou afinitu k cílovému objektu. Zkráceně řečeno, vynález poskytuje sloučeniny, u kterých nedochází k

poklesu relaxivity, vztažené na jeden zbytek zlepšující obraz (IEM), po přidání dalších zbytků zlepšujících obraz (IEMs) v důsledku multilokálně vazebných interakcí (zprostředkovaných množinou zbytků vázajících se k cílovému objektu [TBMs]) a které takto zlepšují kontrast zobrazení, jako i kompozice tyto sloučeniny obsahující a způsoby jejich použití.

### Využití vynálezu

Zobrazení krevního řečiště má mnoho potenciálních diagnostických a terapeutických výhod. Detailní zobrazení oběhového systému může poskytnout informaci, která umožní včasnou detekci například aneurysmy, embólie nebo trombózy a jiných krevních sraženin, jakož i oblastí s omezeným průtokem krve, které se vyskytují v koronárních artériích při arterioskleróze. Jinými obvyklými chorobami oběhového systému, které mohou být přesněji diagnostikovány zobrazením krevního řečiště s vysokou rozlišovací schopností, jsou oběhové nedostatečnosti související s cukrovkou, srdečními nemocemi, lymfedémem, periferním vaskulárním onemocněním, Raynaudovým fenoménem, flebitidou a ostatními poškozeními vystýlky krevního řečiště, srdečním šelestem, žilními městky a dalšími onemocněními odvozenými od poruch srdeční chlopně, jakož i s vaskulitidou. Rovněž kontrastní činidla cílená ke specifickým cílovým objektům mohou zlepšit diagnózu chorob, mezi které patří například neutropenie, která je důsledkem neutrofilní nedostatečnosti. Kromě to je třeba uvést, že magneticko-rezonanční, optické a ostatní typy zobrazení jsou méně invazní než běžné diagnostické techniky, které vyžadují chirurgické řezy a zavedení katetrů pod celkovou anestezií.

Kontrastní činidla pro magneticko-rezonanční zobrazení a optické zobrazení připravená v rámci vynálezu mohou být použita stejným způsobem jako konvenční kontrastní činidla pro magneticko-rezonanční zobrazení a optické zobrazení. V případě zobrazení trombu, lze výhodně použít některé techniky magneticko-rezonančního zobrazení a pulzní sekvence s cílem dosáhnout zlepšení kontrastu trombu oproti pozadí krevního řečiště a tkání. Tyto techniky neomezujícím způsobem zahrnují sekvence typu BBAS (Black Blood Angiography Sequences), usilující o černé zobrazení krve, jakými jsou například sekvence FSES (Fast Spin Echo Sequences) a sekvence FSGES (Flow-Spoiled Gradient Echo Sequences). Tyto metody rovněž zahrnují proudově nezávislé techniky, které zlepšují rozdíl v kontrastu způsobený  $T_1$ -rodílem mezi trombem se zlepšeným kontrastem a krví a tkání a kterými jsou například sekvence typu "inversion-recovery prepared sequence" a "saturation-recovery prepared sequence"; tyto techniky zvyšují kontrast mezi trombem a pozadovými tkáněmi. Rovněž mohou být použity způsoby určené pro  $T_2$ -techniky. Konečně kontrast mohou rovněž zlepšit kontrastní činidla podle vynálezu v přípravcích určených pro magnetizační přenosové techniky.

Kompozice obsahující kontrastní činidla podle vynálezu mohou být formulovány rutinními postupy určenými pro formulování farmaceutických kompozic pro intravenózní podání lidským pacientům nebo zvířatům v rámci zvířecích modelových systémů. Typicky jsou kompozicemi pro intravenózní podání roztoky ve sterilním isotonickém vodném pufru. V případě, že je to nezbytné, může kompozice rovněž obsahovat solubilizační činidlo a lokální anestetikum, jakým je například lignokain, pro tišení bolesti v místě vpichu injekce. Obecně budou jednotlivé složky dodány buď separátně nebo smíšené dohromady v jednotkové dávkové

formě, například jako suchý lyofilizovaný prášek nebo koncentrát prostý vody. Taková kompozice může být skladována v hermeticky uzavřené nádobce, jakou je například ampule nebo sáček s údajem množství účinné látky v jednotkách účinnosti. V případě, že je kompozice podávána ve formě infuze, potom může být vypouštěna s infuzní láhve obsahující sterilní vodu pro injekce nebo fyziologický roztok. V případě, že má být kompozice podána injekcí, může být ampule se sterilní vodou pro injekci nebo fyziologickým roztokem provedena tak, aby mohly být složky kompozice smíšeny bezprostředně před podáním.

Farmaceutické kompozice podle vynálezu obsahují sloučeniny podle vynálezu a jejich farmaceuticky přijatelné soli společně s farmaceuticky přijatelnými pomocnými látkami, nosiči nebo přísadami.

Multilokální kontrastní činidlo s vysokou relaxivitou je výhodně podáváno pacientovi ve formě injikovatelné kompozice. Způsob podání kontrastního činidla pro magneticko-rezonanční zobrazení je výhodně parenterálním, zejména intravenózním, intraarteriálním, intratekálním, intersticiálním nebo intrakavitariálním, podáním. Farmaceutické kompozice podle vynálezu mohou být podané savcům včetně lidí způsobem, který je obdobný se způsobem podání jiných diagnostických nebo terapeutických činidel. Podaná dávka a způsob podání budou závislé na celé řadě faktorů, mezi které zejména patří věk, hmotnost, pohlaví, stav pacienta a jeho genetické faktory, a budou nakonec určeny lékařským personálem po provedení experimentálních stanovení zahrnujících podání měnících se dávek a následné pozorování rezultujícího zobrazení po každé podané dávce. Obecně bude dávka vyžadovaná pro dosažení diagnostické citlivosti nebo terapeutické účinnosti rovna asi 0,001 až

50 000  $\mu\text{g/kg}$ , výhodně rovna 0,01 až 25,0  $\mu\text{g/kg}$  hmotnosti pacienta. Optimální dávka bude stanovena empiricky, jak to bude dále popsáno.

V následujících příkladech budou ilustrovány syntézy a použití několika multilokálních kompozic s vysokou relaxivitou v rámci jednoho provedení podle vynálezu. Specifické parametry uvedené v následujících příkladech jsou voleny tak, aby ilustrovaly praxi uplatňovanou v rámci vynálezu, přičemž tyto příklady mají pouze ilustrační charakter a nikterak neomezují vlastní rozsah vynálezu. I když byl výše popsán určitý počet provedení a znaků vynálezu, je samozřejmé pro odborníky v daném oboru, že lze výše popsané provedení a znaky modifikovat a obměňovat, aniž by takové modifikace a obměny představovaly vybočení mimo podstatu vynálezu nebo mimo rozsah připojených nároků.

## Příklady provedení vynálezu

### Příklad 1

#### Způsob stanovení relaxivity

Sloučeniny podle vynálezu byly vyhodnoceny s cílem stanovit jejich relaxivitu za použití NMR-spektrometru typu NMS-120 Minispec provozovaného při 0,47 Tesla (Larmorova frekvence 20 MHz H-1) a teplotě 37 °C. Hodnota  $T_1$  protonů vody byla stanovena za použití softwaru pro inverzní regenerační pulzní sekvenci. Relaxivita byla stanovena v přítomnosti cílového objektu (kterým je typicky 4,5% lidský sérový albumin) připravením čtyř individuálních vzorků. První vzorek obsahoval pouze 4,5% lidský sérový albumin ve fosfátem pufovaném fyziologickém roztoku (PBS, Phosphate Buffered Saline), zatímco ostatní tři vzorky obsahovaly kromě 4,5% lidského sérového albuminu ve fosfátem pufovaném fyziologickém roztoku asi 20, 30 a 40  $\mu\text{M}$  Gd(III). Tyto vzorky se potom inkubují při teplotě 37 °C po dobu alespoň 15 minut za účelem dosažení rovnovážného stavu teploty ještě před vlastním měřením hodnoty  $T_1$ . Obsah Gd(III) ve vzorku se stanoví hmotovou spektrometrií s indukčně spřaženou plazmou (ICP-MS). Relaxivita (vztažená na jeden Gd(III)-ion) se stanoví vynesemím relaxační rychlosti ( $1/T_1$ ) v  $\text{s}^{-1}$  proti koncentraci Gd(III) v nM. Směrnice křivky získané vynesemím získaných hodnot odpovídá relaxivitě. Rovněž se analogickým způsobem stanoví relaxivita sloučenin v nepřítomnosti cílového objektu.

Koncentrace subjektů vázaných na cílový objekt za těchto podmínek se stanoví separátním experimentem a to za

použití například ultrafiltrace nebo rovnovážné dialýzy. Znalost množství subjektů vázaných k cílovému objektu, relaxivity v přítomnosti cílového objektu a relaxivity v nepřítomnosti cílového objektu umožňuje výpočet výše popsané střední vázané relaxivity.

## Příklad 2

Experimentální model pro testování kontrastních činidel podle vynálezu vázajících se k fibrinu

Kontrastní činidlo s vysokou relaxivitou a specifičností pro zobrazení krevní sraženiny (trombu), popsané v těchto příkladech, je schopné rozlišit mezi fibrinem v krevní sraženině a cirkulujícím fibrinogenem. Toto kontrastní činidlo je schopné poskytnout citlivou účinnou detekci trombózy v různých stádiích jejího vývoje. Toto činidlo může být použito pro diagnózu přítomnosti nebo absence raných nebo pokročilých trombů.

Jedním ze zvířecích modelů, které mohou být použity je model trombu v králičí hrdelní žíle indukovaný zaškrcením svorkou hrdelní žíly. Hrdelní žíla se zaškrtí svorkou ve dvou polohách, načež se odebere králičí krev mezi oběma svorkami. Do žíly mezi oběma svorkami se potom zavedou lidský fibrinogen, králičí červené krvinky a trombin s cílem vytvořit zde krevní sraženinu obsahující lidský fibrin. Krevní sraženina se ponechá typicky stárnout po dobu 30 minut.

V rámci tohoto králičího modelu s krevní sraženinou v hrdelní žíle je typickým zařízením zařízení 1,5 Tesla s použitím rušivého gradientu (SPGR) magneticko-rezonančního zobrazení při 36/5/30 deg. Alternativně může být použit způsob zobrazení 3D GRE 44/10/30 deg se zařízením 1,5 Tesla. Alternativně mohou být použity způsoby IR 2000/10/700 se zařízením 1,5 Tesla.

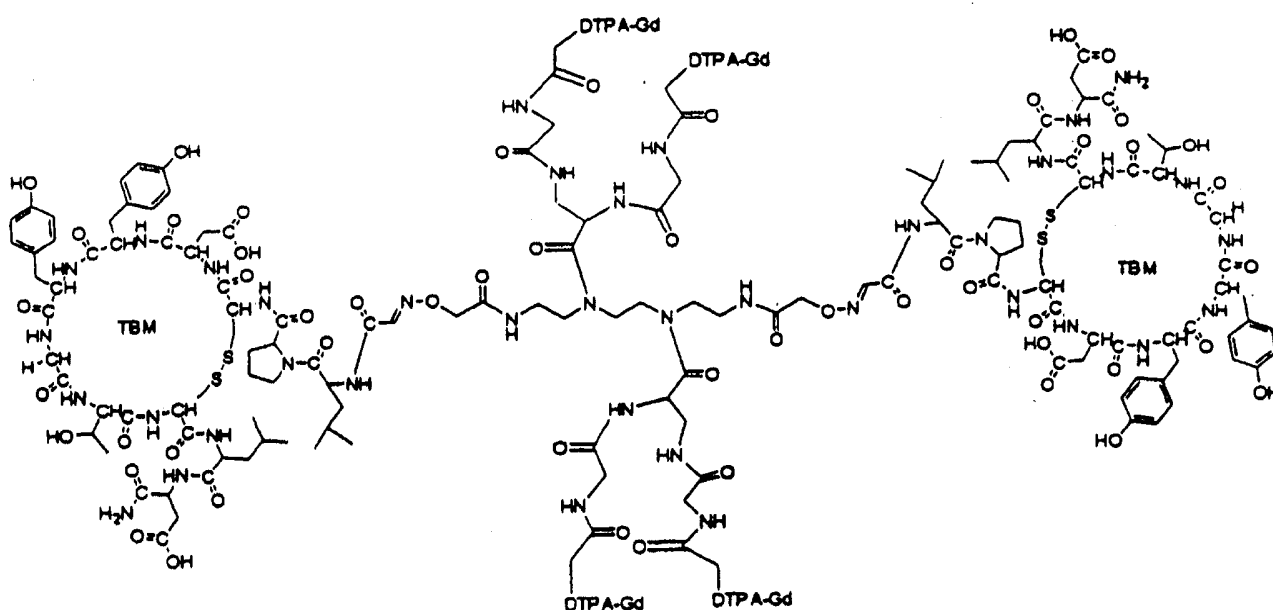
### Příklad 3

### Příkladná sloučenina: Syntéza

Výhodnou formu provedení vynálezu představuje kontrastní činidlo pro magneticko-rezonanční zobrazení, které má chemickou strukturu znázorněnou na obr.13.

Obr.13

Sloučenina M8-11

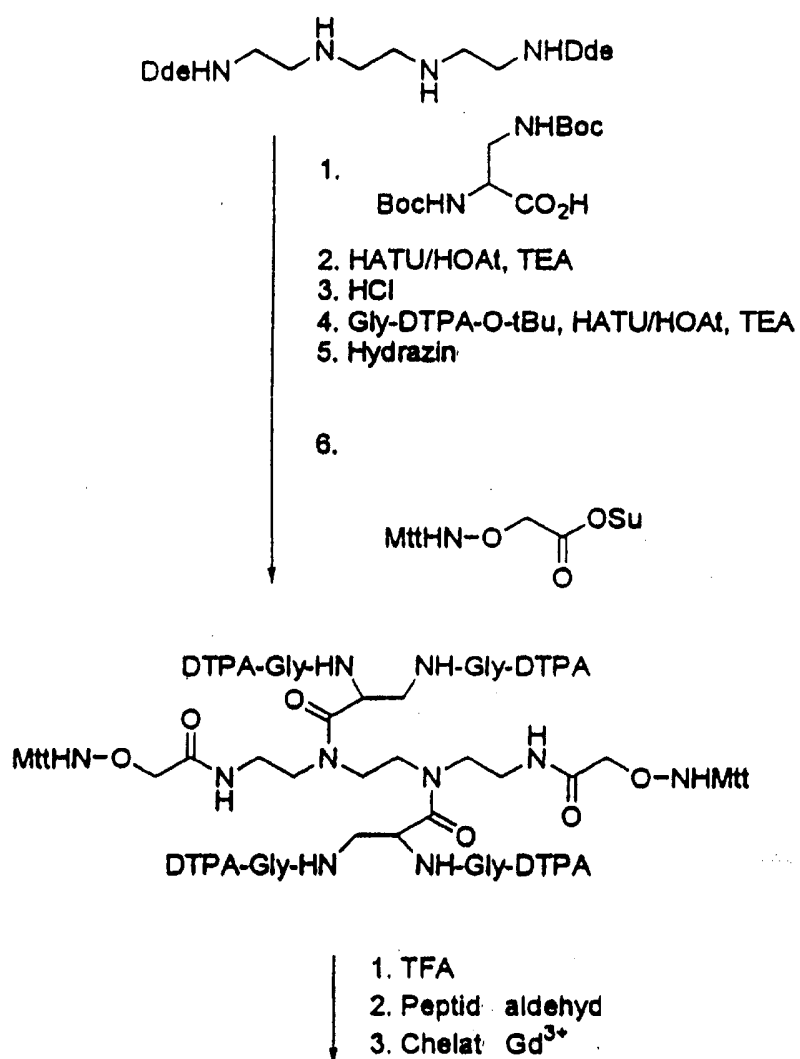


Kontrastní činidlo, jehož chemická struktura je uvedena na obr.13, obsahuje čtyři DTPA-Gd-molekuly, které slouží jako zbytky zlepšující obraz (IEMs). Tyto zbytky zlepšující obraz (IEMs) jsou připojeny k ethylendiaminovému lešení prostřednictvím linkerů, které obsahují řadu opakujících se amidů. Zbytky vázajícími se k cílovému objektu (TBMs) jsou tvořeny dvěma peptidy, které mají vysokou afinitu k fibrinu. Tyto peptidy mohou cyklizovat vytvořením disulfidové vazby mezi dvěma cysteinovými zbytky. Tyto zbytky vázající se k cílovému objektu jsou připojeny k lešení prostřednictvím oximové a amidové vazby.

Při 37 °C a za použití 10  $\mu\text{M}$  kontrastního činidla, 2,5 mg/ml fibrinu, 50 mM Tris-pufry, 150 mM NaCl, 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , pH 7,4 je 51 % prototypového činidla vázáno na DD(E)-aminokyselinový fragment fibrinu. Relaxivita vázané sloučeniny, měřená při 20 MHz a 37 °C, činí 101,4  $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ , což představuje 25,4  $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ , vztaženo na jeden Gd-chelát. Volné (nevázané) kontrastní činidlo má relaxivitu 67,7  $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ , což představuje relaxivitu vztaženou na jeden Gd-chelát rovnou 16,9  $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Relaxivita kontrastního činidla se mírně zvýší po vazbě k cílovému objektu. Syntéza prototypového peptidového multimerního kontrastního činidla pro magneticko-rezonanční zobrazení peptidového trombu je popsána na obr.14. I když jsou zobrazeny specifický peptid a specifické kontrastní činidlo (M8-11), je pro odborníka zřejmé, že i další peptidy mohou být použity v uvedené sloučenině a že peptidy použité v této sloučenině nemusí být totožné.

Obr.14

Syntéza multimerního kontrastního činidla cíleného na lidský fibrin



M8-11

## Experimentální část

## Syntéza DiDde-tetraaminu

Tetraamin (Fluka) (1,50 ml) se uvede v reakci s Dde-OH (NovaBiochem) (4,0 g) ve 30 ml ethylalkoholu. Získaný čirý světležlutý roztok se potom zahřívá na teplotu varu pod zpětným chladičem po dobu 16 hodin. Po ukončení reakce se reakční směs zahustí za vakua za účelem vysušení zbytku. Získaný zbytek se potom rozpustí ve 250 ml etheru a 2N vodném roztoku kyseliny chlorovodíkové. Světležlutá kyselá vodná vrstva se oddělí, načež se k ní přidává 50% roztok hydroxidu sodného až k dosažení hodnoty pH 12, načež se tato vrstva zpětně extrahuje ethylacetátem. Ethylacetátové vrstvy se promyjí solankou, vysuší nad síranem sodným a zfiltrují. Získaný filtrát se odpaří za vakua k získání světležlutého žmolkovitého produktu (2,9 g), který se přečistí mžikovou chromatografií na sloupci silikagelu za použití chromatografické soustavy tvořené směsí ethylacetátu a methanolu v objemovém poměru 2:3 a potom směsí ethylacetátu a methanolu obsahujícího 1 %  $\text{NH}_4\text{OH}$  v objemovém poměru 2:3 k získání čistého požadovaného světležlutého pevného produktu (2,3 g).

$^1\text{H}$ -Nukleární magneticko-rezonanční spektrum:

(300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

|          |                    |                    |           |
|----------|--------------------|--------------------|-----------|
| $\delta$ | 1,02 (s, 6H),      | 2,34 (s, 4H, 2),   | 2,56 (s), |
|          | 2,79 (s, 2H),      | 2,92-2,94 (t, 2H), |           |
|          | 3,48-3,54 (q, 2H), |                    |           |
|          | 198,2              |                    |           |

Hmotové spektrum:

$m/z$  475,2 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ .

## Syntéza DiDde-tetraaminu-di-Dpr(Boc)

Boc-Dpr(Boc)-OH.DCHA (4,85 g) se suspenduje v 60 ml ethylacetátu společně s 12,0 ml 2M kyseliny sírové. Obsah baňky se protřepe a ethylacetátová vrstva se oddělí. Vodná vrstva se zpětně extrahuje ethylacetátem. Ethylacetátové vrstvy se sloučí, promyjí solankou, vysuší nad bezvodým síranem hořečnatým a zfiltrují. Získaný filtrát se odpaří za vakua a získaný pevný produkt se vysuší k získání 3,23 g požadované volné kyseliny Boc-Dpr(Boc)-OH ve formě bílého krystalického pevného produktu.

<sup>1</sup>H-Nukleární magnetickorezonanční spektrum:

(300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)

δ 1,35(s,18H), 3,30(s,2H), 3,96-3,98(m,1H),  
6,87-6,90(d,1H).

Boc-Dpr(Boc)-OH ve formě volné kyseliny (1,52 g) se rozpustí v 15 ml DCM při teplotě 0 °C. K získanému roztoku se přidá HOAt (0,68 g) a DIEA (0,35 ml) a získaný čirý roztok se míchá při teplotě 0 °C. Přidá se DiDde-tetraamin získaný při výše uvedené syntéze, načež se ještě přidá HATU (1,90 g) a 2 mmol TEA. Potom se přidá bezvodý DMF (5 ml) a reakční směs se míchá po dobu 36 hodin. Rozpouštědla se potom odpaří za vakua a zbytek se vyjme ethylacetátem a promyje 1N kyselinou chlorovodíkovou, nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného, solankou a potom se vysuší nad síranem sodným, zfiltruje a odpaří za vakua k získání bílého pevného produktu (1,92 g). Tento pevný produkt se potom přečistí mžikovou chromatografií na sloupci silikagelu za použití chromatografické soustavy tvořené ethylacetátem obsahujícím 5 % methanolu k získání požadované sloučeniny ve formě bílého pevného produktu (1,3 g).

$^1\text{H}$ -Nukleární magnetickorezonanční spektrum:

(300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

$\delta$  1,01 (s, 6H), 1,35 (s, 18H), 2,34 (s, 4H),  
2,58 (s, 3H), 3,30 (s, 2H), 3,44-3,67 (bm, 6H),  
3,85-4,10 (m, 1H), 5,44-5,52 (d, 2H), 5,74 (bs, 1H).

Hmotové spektrum:

$m/z$  1047,7 ( $M+H$ ) $^+$ .

Syntéza Di-Dde-tetraamin-diDpr ve formě HCl-soli

DiDde-tetraamin-diDpr(BOC) $_2$  se rozpustí ve 40 ml směsi 4N kyseliny chlorovodíkové a dioxanu a získaný roztok se míchá po dobu 10 hodin. Získaná suspenze se rozetře s chladným etherem a odpaří za vakua k získání hojného množství bílého pevného produktu. Tento pevný produkt se vysuší za vakua vysokovakuové vývěvy k získání požadovaného produktu ve formě HCl-soli.

Výtěžek: 1,09 g.

Hmotové spektrum:

$m/z$  647,3 ( $M+H$ ) $^+$ .

Syntéza DiDde-diDpr-tetra-GlyDTPA-OtBu

Gly-DTPA-penta-t-butylester (Gly-DTPA-O-tBu) (2,37 g) se vyjme 10 ml dimethylformamidu při teplotě 0 °C. Přidá se HOAt (0,41 g) a DIEA (0,52 ml), načež se získaný roztok míchá při teplotě 0 °C. Di-Dde-tetraamin-diDpr-sůl připravená výše uvedeným způsobem (0,39 g) se rozpustí ve 3 ml dimethylformamidu, načež se k získanému roztoku přidá DIEA (0,13 ml). Ke směsi se přidá HATU (1,14 g) společně s dalším podílem DIEA (0,09 ml). Žlutě zbarvený roztok se míchá po dobu 36 hodin. Rozpouštědla se odstraní za vakua a

získaný zbytek se vyjme ethylacetátem. Organická vrstva se promyje 1N kyselinou chlorovodíkovou, nasyceným vodným roztokem hydrogenuhličitanu sodného a solankou, vysuší nad bezvodým síranem sodným, zfiltruje a odpaří za vakua k získání světležlutého pevného produktu (3,15 g). Získaný surový produkt se dále přečistí vysoce výkonnou kapalinovou chromatografií na sloupci Prep RP-HPLC [C-4, ACN/H<sub>2</sub>O]. Frakce obsahující požadovanou sloučeninu se sloučí a lyofilizují k získání bílého pevného produktu.

Výtěžek: 1,01 g.

Hmotové spektrum:

m/z 1244,4 (M+3H)<sup>3+</sup>; 933,9 (M+4H)<sup>4+</sup>.

#### Syntéza tetraamin-tetra-CN-GlyDTPA-O-tBu

DiDde-tetraamin-diDpr-tetra-GlyDTPA-O-tBu (0,38 g) se rozpustí v 8 ml 2% (obj./obj.) hydrazinu v dimethylformamidu a získaný roztok se míchá po dobu 10 minut při okolní teplotě. Reakční směs se potom zahustí za vakua a zbytek se vyjme v CH<sub>3</sub>CN a přečistí vysoce výkonnou kapalinovou chromatografií na sloupci Prep-RP-HPLC [C-4, ACN/H<sub>2</sub>O]. Frakce obsahující požadovanou sloučeninu se sloučí a lyofilizují k získání bílého pevného produktu.

Výtěžek: 0,25 g.

Hmotové spektrum:

m/z 1702,1 [M+2H]<sup>2+</sup>; 1135,1 [M+3H]<sup>3+</sup>.

#### Syntéza Di-Meo-trityl-AoA-tetra-Gly-DTPA-O-tBu

Tetraamin-tetra-Gly-DPTA-O-tBu (98 mg) se rozpustí ve 3 ml dimethylformamidu při teplotě 0 °C. K získanému roztoku se přidá sukcinimidester kyseliny methoxytritylaminoxy-

octové (MeO-Trt-AoA-OSu) (29 mg) společně s TEA (9  $\mu$ l) a získaná směs se míchá přes noc, načež se přidá methanol, rozpouštědla se odpaří a zbytek se extrahuje za použití DCM, promyje 10% vodným roztokem kyseliny citronové a solankou a vysuší nad bezvodým síranem hořečnatým. Získaný produkt se dále přečistí vysoce výkonnou kapalinovou chromatografií na sloupci Prep RP-HPLC [C-4, ACN/H<sub>2</sub>O]. Frakce obsahující požadovaný produkt se sloučí a lyofilizují k získání bílého pevného produktu.

Výtěžek: 87 mg.

Hmotové spektrum:

m/z 2047,5 (M+2H)<sup>2+</sup> ; 1365,3 (M+3H)<sup>3+</sup>.

#### Syntéza AoA-tetra-GlyDTPA-OH

Di-Meotrityl-AoA-tetra-GlyDTPA-O-tBu (85 mg) se rozpustí v 10 ml CH<sub>3</sub>Cl/thioanisol/DCM/TIS (64/16/16/4) a získaný roztok se míchá při teplotě 0 °C po dobu 3 hodin. Tis je (iPr)<sub>3</sub>SiH. Reakční směs se potom zředí 20 ml vody a extrahuje etherem. Vodná vrstva se dále přečistí vysoce výkonnou kapalinovou chromatografií na sloupci Prep RP-HPLC [C-18, ACN/NH<sub>4</sub>OAc]. Produkt se izoluje a lyofilizuje k získání bílého pevného produktu.

Výtěžek: 29 mg.

Hmotové spektrum:

m/z 1214,4 (M+2H)<sup>2+</sup>; 809,5 (M+3H)<sup>3+</sup>.

#### Oxidace SLPCDYGTCLD-NH<sub>2</sub>

Peptid c[SLPCDYGTCLD-NH<sub>2</sub>] (10 mM) v NaPi-puftru, pH=6,8 se uvede v reakci s NaIO<sub>4</sub> (20 mM). Oxidace se přeruší ethylenglykolem. Reakční směs se rozdělí na sloupci C-18

Sep-Pak. Produkt se potom eluuje 80% CH<sub>3</sub>CN obsahujícím 0,1 % TFA. Rozpouštědla se odstraní odstředěním za vakua a požadovaný produkt alfa-N-glyoxylyl-c[ LPCDYGTCLD-NH<sub>2</sub>] se lyofilizuje k získání bílého prášku.

Hmotové spektrum:

m/z 1315,5 (M+H)<sup>+</sup>.

Chemoselektivní vazba-finální sestava: syntéza M8-11

Alfa-N-glyoxylyl-c[ LPCDYGTCLD-NH<sub>2</sub>] (13,2 mg) se uvede v reakci s AoA-tetraDOTA-OH (12,3 mg) ve 20 mM natriumacetátového pufru, pH 4,6 při teplotě 22 °C. Reakční produkt se přečistí vysoce výkonnou kapalinovou chromatografií na sloupci Semi-Prep RP-HPLC [C-18, CH<sub>3</sub>CH/5mm NH<sub>4</sub>OAc]. Tento materiál se převede na gadoliniový komplex za použití standardních technik [viz například, Lauffer R.B., a kol., Radiology 207: str. 529-38 (1998)].

Hmotové spektrum:

m/z 1674,6 (M+3H)<sup>3+</sup> ; 1256,3 (m+4H)<sup>4+</sup>.

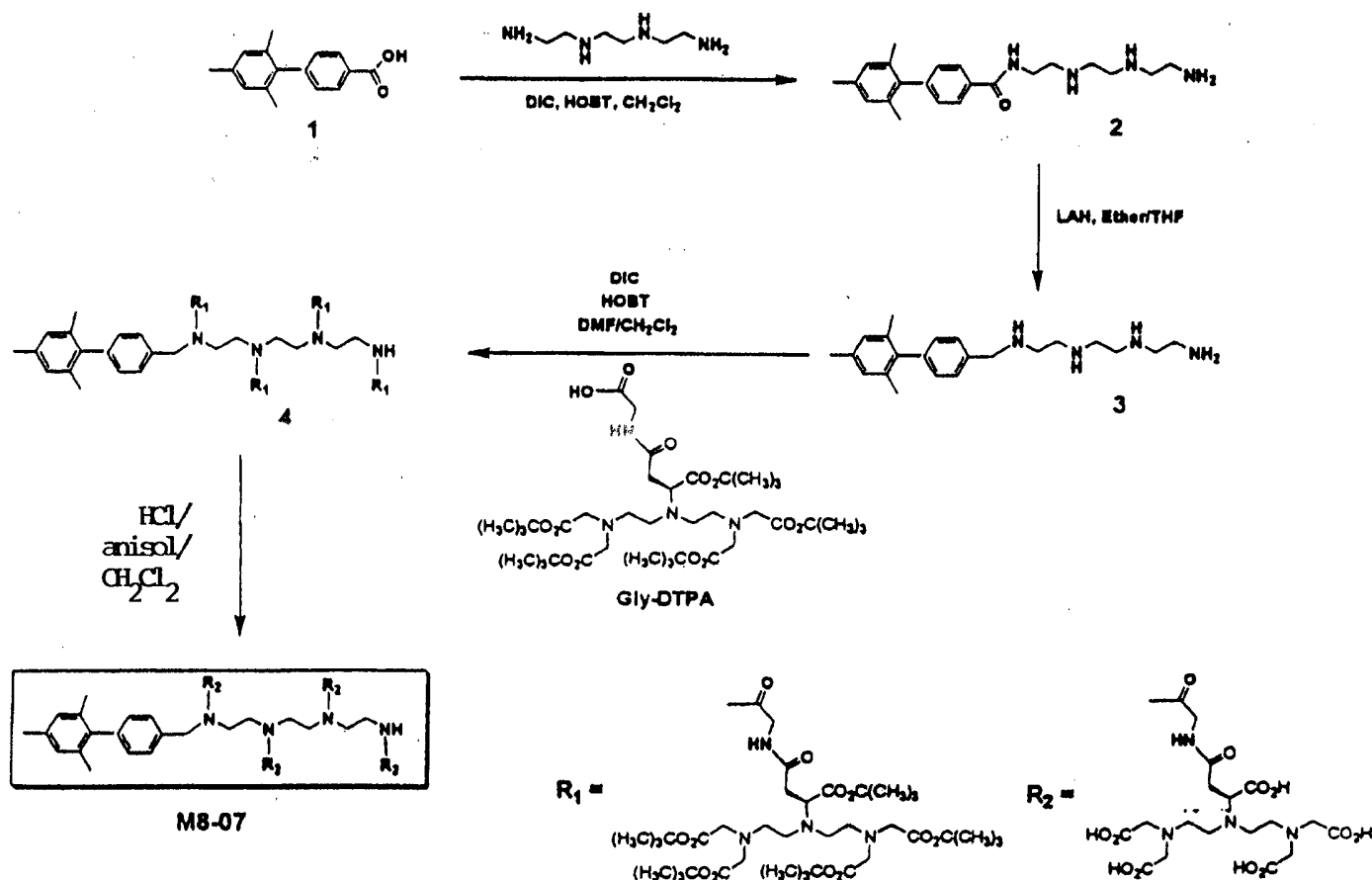
#### Příklad 4

Syntéza kontrastních činidel s triethylentetraaminovým lešením

Za použití Di-Dde-tetraamin-diDpr a výše popsaných postupů společně se substitucemi pro diamino-BOC-substituovaný ethanový linker a Gly-DTPA-OtBu-zbytkem zlepšujícím obraz (IEM) mohou být různé výše popsané cheláty připojeny triethylentetraaminovému lešení. Uvedené cheláty mohou být stejné nebo odlišné, přičemž se získá homogenní chelátové činidlo nebo kontrastní činidlo s heterogenními cheláty.

## Příklad 5

## Syntéza kontrastního činidla M8-07



K roztoku kyseliny 4-mesitylbenzoové (0,7 g) a triethylentetraminu (4,26 g) v methylenchloridu (200 ml) se přidá HOBT (0,89 g, 5,83 mmol) a DIC (0,74 g). Získaná směs se míchá při teplotě okolí přes noc. Získaná sraženina se odfiltruje a rozpouštědlo se odežene za sníženého tlaku,

příčemž se získá žlutý olej. Reakční směs se potom rozdělí vysoce výkonnou chromatografií na sloupci Prep-HPLC C4 za použití chromatografické soustavy tvořené směsí 0,1%TFA/H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN, přičemž se získají TFA-soli monoamidu ve formě bílé pěny.

Výtěžek: 0,63 g.

Hmotové spektrum LC-MS:

(m/e) 369,1 (M<sup>+</sup>).

K roztoku výše uvedeného monoamidu (0,63 g) v etheru (100 ml) a THF (100 ml) se pozvolna při okolní teplotě přidá LAH (1,30 g). Získaná směs se potom zahřívá na teplotu varu pod zpětným chladičem, načež se ještě míchá při okolní teplotě přes noc. Ke směsi se potom přidá po kapkách voda za účelem eliminace LAH. Získaná sraženina se odstraní filtrací a rozpouštědlo se odstraní za sníženého tlaku, přičemž se získá bezbarvý olej. Reakční směs se rozdělí vysoce výkonnou kapalinovou chromatografií na sloupci Prep-HPLC C4 za použití chromatografické soustavy tvořené směsí 0,1%THA/H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN, přičemž se získá TFA-aminová sůl ve formě bílé pěny.

Výtěžek: 180 mg).

Hmotové spektrum LC-MS:

(m/e) 354,4 (M<sup>+</sup>).

K roztoku TFA-aminové soli (180 mg) a diisopropylethylaminu (287 mg) v dimethylformamidu (50 ml) se přidá roztok Gly-DTPA-OtBu (1,88 g) v methylenchloridu (50 ml), HOBt (370 mg) a DIC (301 mg). Směs se potom míchá při okolní teplotě přes noc. Rozpouštědlo se odstraní za sníženého tlaku, přičemž se získá žlutý olej. Reakční směs se rozdělí vysoce výkonnou kapalinovou chromatografií na sloupci Prep-HPLC C4 za použití eluční soustavy tvořené 0,1%TFA/H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN, přičemž se získá surový produkt ve formě

bílého pevného produktu.

Výtěžek: 0,36 g.

Hmotové spektrum LC-MS:

(m/e) 1719,4 ( $M^{2+}$ ), 1147,2 ( $M^{3+}$ ).

K roztoku tohoto bílého produktu (0,19 g) v methylenchloridu (4,5 ml) a anisolu (4,5 ml) se po kapkách přidá 4,5 ml 12N roztoku kyseliny chlorovodíkové. Získaná směs se potom míchá při okolní teplotě po dobu 3 hodin. Ke směsi se přidá 40 ml vody a směs se třikrát promyje etherem. Vodný roztok se lyofilizuje k získání surového produktu, které se podrobí vysoce výkonné kapalinové chromatografii na sloupci Prep-HPLC C18 za použití chromatografické soustavy tvořené směsí 100mM AcONH<sub>4</sub>/CH<sub>3</sub>CN, přičemž se získá bílý pevný produkt.

Výtěžek: 50 mg.

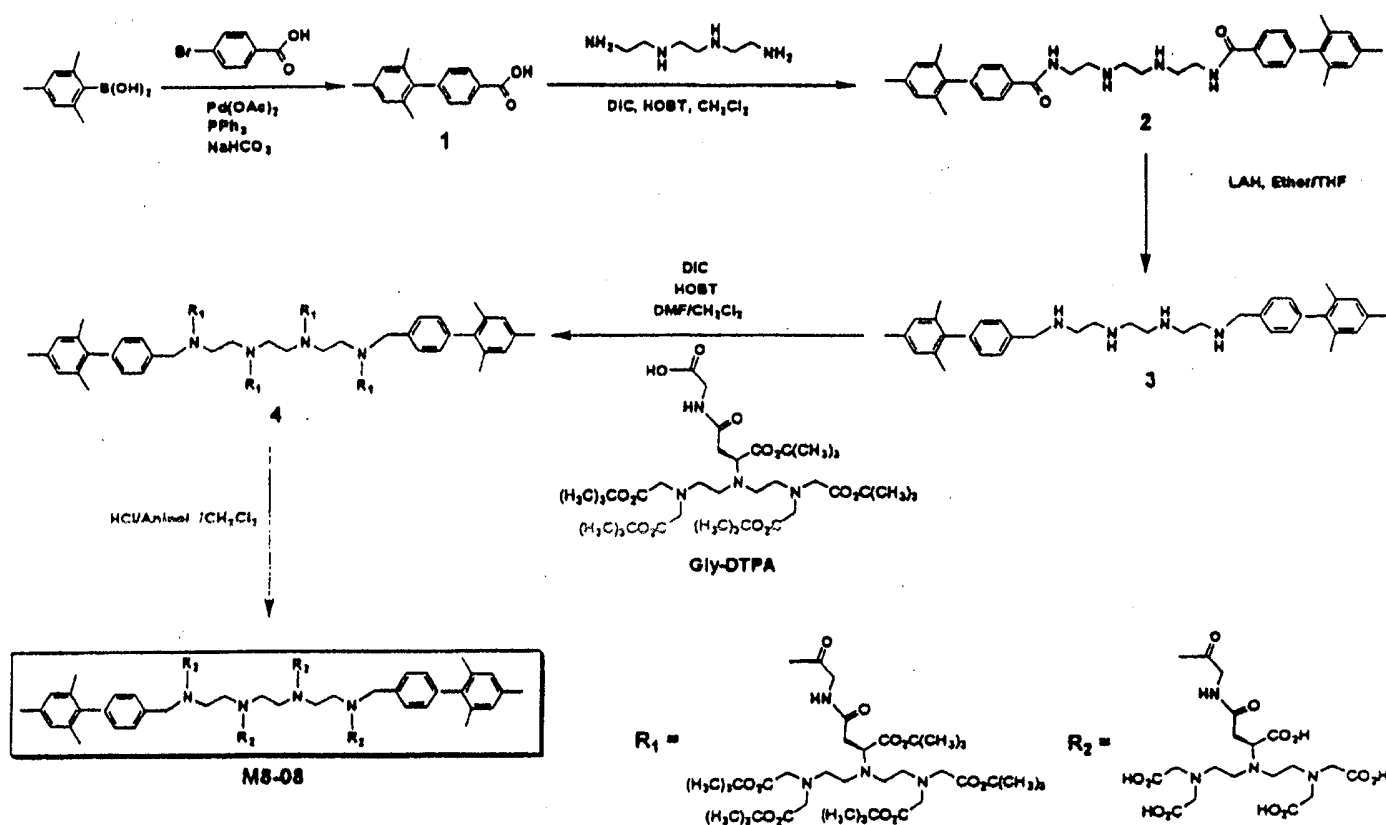
Hmotové spektrum LC-MS:

(m/e) 1158,6 ( $M^{2+}$ ), 772,8 ( $M^{3+}$ ).

Tento materiál se převede na gadoliniový komplex za použití standardních technik [viz například Lauffer R.B. a kol. Radiology 207: str.529-38 (1998)].

## Příklad 6

## Syntéza kontrastního činidla M8-08



## Kyselina 4-mesitylbenzoová

K roztoku kyseliny mesitylboronové (10 g) a kyseliny 4-brombenzoové (12,9 g) v 1-propanolu (150 ml) a DME (200 ml) se přidá trifenylyfosfin (0,128 g), 2M roztok uhličitanu sodného (37 ml) a voda (30 ml). K získané směsi se potom přidá octan palladnatý (82 mg) pod dusíkovou atmosférou. Směs se potom přes noc zahřívá na teplotu varu pod zpětným chladičem. Po odstranění zdroje tepla se přidá 100 ml vody a směs se míchá za chlazení na okolní teplotu po dobu 2,5

hodiny. Tmavá reakční směs se zředí 150 ml ethylacetátu a vytvořené dvě fáze se rozdělí. Organická vrstva se několikrát promyje nasyceným vodným roztokem hydrogenuhličitanu sodného až chromatografie na tenké vrstvě ukazuje, že došlo k úplnému odstranění kyseliny 4-brombenzoové ( $R_f = 0,55$  za použití eluční soustavy tvořené směsí methylenchloridu a methanolu v objemovém poměru rovném 5). Získaný roztok se potom třikrát extrahuje 200 ml 1N roztoku hydroxidu sodného. Ke sloučeným vodným vrstvám se přidá asi 50 ml 12N kyseliny chlorovodíkové k dosažení hodnoty pH rovné 3. Získaná sraženina se odfiltruje, promyje vodou a vysuší k získání kyseliny 4-mesitylbenzoové ve formě bílého pevného produktu.

Výtěžek: 8,81 g)

$R_f = 0,75$  (eluční soustava:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH} = 5$ ).

$^1\text{H}$ -Nukleární magnetickorezonanční spektrum:

(300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

$\delta$  1,997 (s, 6H), 2,340 (s, 3H), 6,961 (s, 2H),  
7,274 (d,  $J=8,1\text{Hz}$ , 2H), 8,177 (d,  $J=8,1\text{Hz}$ , 2H).

K roztoku kyseliny 4-mesitylbenzoové (1,5 g) a triethyltetraminu (0,43 g) v methylenchloridu (60 ml) se přidá HOBt (0,96 g) a DIC (0,79 g). Získaná směs se míchá při okolní teplotě přes noc. Získaná sraženina se odfiltruje a vysuší, přičemž se získá bílý pevný produkt.

Výtěžek: 1,45 g.

Hmotové spektrum LC-MS:

(m/e) 591,3 ( $\text{M}^+$ ).

K roztoku uvedeného bílého pevného produktu (0,45 g) v etheru (20 ml) a tetrahydrofuranu (80 ml) se pozvolna při okolní teplotě přidá LAH (0,33 g). Směs se potom zahřívá na teplotu varu pod zpětným chladičem po dobu 2 hodin, načež se míchá přes noc při okolní teplotě. Ke směsi se potom po

kapkách přidá voda za účelem eliminace LAH. Získaná sraženina se odstraní filtrací a rozpouštědlo se odežene za sníženého tlaku, přičemž se získá světležlutý olej. Reakční směs se potom rozdělí vysoce výkonnou kapalinovou chromatografií na sloupci Prep-HPLC C4 za použití chromatografické soustavy tvořené směsí 0,1%TFA/H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN, přičemž se získá TFA-sůl ve formě bílého pevného produktu. Výtěžek: 140 mg.

Hmotové spektrum LC-MS:

(m/e) 564,6 ( $M^+$ ).

K roztoku TFA-soli (50 mg) a diisopropylethylaminu (38 mg) v dimethylformamidu (30 ml) se přidá roztok Gly-DTPA-OtBu (193 mg) v methylenchloridu (30 ml), HOBt (37,5 mg) a DIC (31 mg). Směs se potom míchá přes noc při okolní teplotě. Rozpouštědlo se odstraní za sníženého tlaku, přičemž se získá hnědý olej. Reakční směs se rozdělí vysoce výkonnou kapalinovou chromatografií na sloupci Prep-HPLC C4 za použití chromatografické soustavy tvořené směsí 0,1%TFA/H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN, přičemž se získá surový produkt ve formě světležlutého pevného produktu.

Hmotové spektrum LC-MS:

(m/s) 1824,2 ( $M^{2+}$ ), 1216,3 ( $M^{3+}$ ), 912,5 ( $M^{4+}$ ).

K roztoku uvedeného světležlutého pevného produktu (0,58 g) v methylenchloridu (5 ml) a anisolu (5 ml) se po kapkách přidá 10 ml 12N roztoku kyseliny chlorovodíkové. Získaná směs se míchá při okolní teplotě po dobu 3 hodin. Ke směsi se přidá 40 ml vody a získaná směs se třikrát promyje etherem. Vodný roztok se lyofilizuje k získání surového produktu, který se podrobí vysoce výkonné kapalinové chromatografii na sloupci Prep-HPLC C18 za použití chromatografické soustavy tvořené směsí 100mM AcONH<sub>4</sub>/CH<sub>3</sub>CN, přičemž se získá bílý pevný produkt.

Výtěžek: 11 mg.

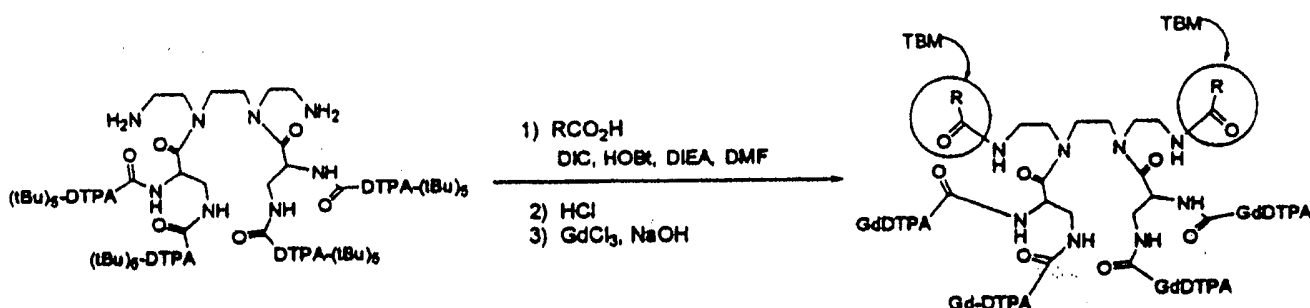
Hmotové spektrum LC-MS:

(m/e) 1263,2 ( $M^{2+}$ ), 842,4 ( $M^{3+}$ ), 632,2 ( $M^{4+}$ ).

Tento materiál se převede na gadoliniový komplex za použití standardních technik [viz například Lauffer R.B. a kol., Radiology 207: str. 529-38 (1998)].

#### Příklad 7

Obecná syntéza multimerů pro vazbu s lidským sérovým albuminem obsahujících dva stejné zbytky vázající se k cílovému objektu (TBMs)



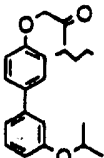
Diamin obsahující čtyři terc-butylesterem chráněné DTPA-skupiny se rozpustí v dimethylformamidu (0,75 ml). Přidá se  $\text{RCO}_2\text{H}$  (3 ekv.), který znamená různé karboxylové kyseliny tvořící zbytky vázající se k cílovému objektu (TBMs), DIC (0,052 ml, 3,3 ekv.) a HOBT (0,051, 3,3 ekv.). Reakční směs se ochladí na teplotu  $0^\circ\text{C}$  předtím, než se k ní po kapkách přidá DIEA (0,105 ml, 6 ekv.). Reakční směs

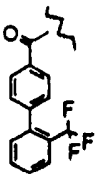
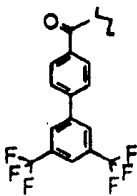
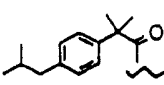
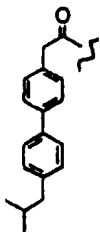
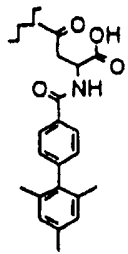
se potom míchá při okolní teplotě po dobu celkem 8,5 hodiny. Reakční směs se zředí methylenchloridem a promyje 0,1N roztokem kyseliny chlorovodíkové, nasyceným vodným roztokem hydrogenuhličitanu sodného a solankou. Organická vrstva se vysuší nad síranem sodným a zbylé rozpouštědlo se odežene za vakua k získání terc-butylesterem chráněného meziprojektu. Produkt se potom vyjme v DCM, při teplotě 0 °C se přidá kyselina chlorovodíková a získaná směs se míchá po dobu 3 hodin. Po odpaření rozpouštědla se získá bílý pevný produkt, který se uvede v reakci s  $\text{GdCl}_3$  (4 ekv.) a  $\text{NaOH}$  (12 ekv.) k získání finálního produktu.

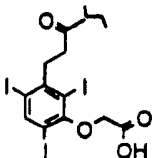
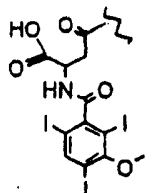
Seznam sloučenin majících dva stejné zbytky vázající se k cílovému objektu (TBMs) a syntetizovaných výše uvedenou metodou je společně se strukturami zbytků vázajících se k cílovému objektu (TBMs) a hmotovými spektry uveden v následující tabulce 3.

Tabulka 3

Multilokální kontrastní činidla se dvěma stejnými zbytky vázajícími se k cílovému objektu (TBMs).

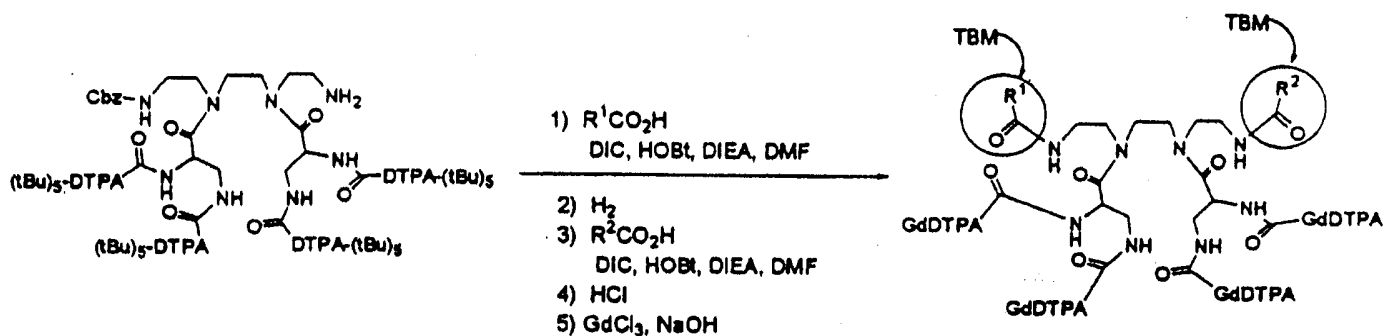
| Sloučenina   | Chemická struktura TBM<br>R v obecném syntézním schématu                            | Hmotové spektrum<br>(m/z, $[\text{M}]^{+}$ ) |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| <b>M8-12</b> |  | <b>1048.5</b>                                |

| Sloučenina   | Chemická struktura TBM R<br>v obecném syntézním schématu                            | Hmotové spektrum<br>(m/z, [M] <sup>3+</sup> ) |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| <b>M8-13</b> |    | <b>1036.9</b>                                 |
| <b>M8-14</b> |   | <b>1080.9</b>                                 |
| <b>M8-15</b> |  | <b>1005.0</b>                                 |
| <b>M8-16</b> |  | <b>1036.8</b>                                 |
| <b>M8-17</b> |  | <b>1094.1</b>                                 |

| Sloučenina | Chemická struktura TBM R<br>v obecném syntézním schématu                          | Hmotové spektrum<br>(m/z, [M] <sup>3+</sup> ) |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| M8-18      |  | 1259.1                                        |
| M8-19      |  | 1288.51                                       |

## Příklad 8

Obecná syntéza multimerů pro vazbu k lidskému sérovému albuminu obsahující dva různé zbytky vázající se k cílovému objektu (TBMs)



CBz-chráněný monoamin obsahující čtyři terc-butylesterem chráněné DTPA-skupiny se rozpustí v dimethylformamidu (0,75 ml). Přidá se  $R^1CO_2H$  (1,5 ekv.), který znamená různé karboxylové kyseliny tvořící zbytky vázající se k cílovému objektu (TBMs), DIC (0,052 ml, 1,5

ekv.) a HOBt (0,051 g, 1,5 ekv.). Reakční směs se ochladí na teplotu 0 °C ještě předtím, než se po kapkách přidá DIEA (0,105 ml, 6 ekv.). Získaná reakční směs se míchá při okolní teplotě po dobu celkem 8,5 hodiny.

Reakční směs se zředí methylenchloridem a promyje 0,1N kyselinou chlorovodíkovou, nasyceným vodným roztokem hydrogenuhlíčitanu sodného a solankou. Organická vrstva se vysuší nad síranem sodným a zbylé rozpouštědlo se odstraní za vakua.

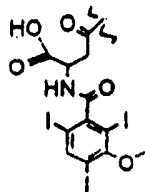
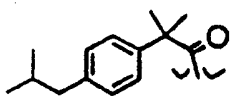
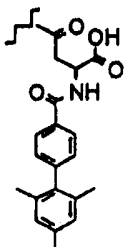
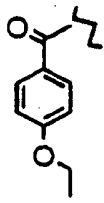
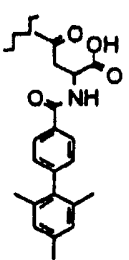
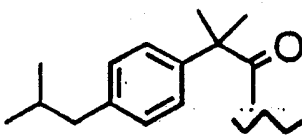
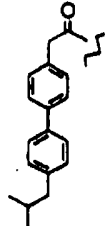
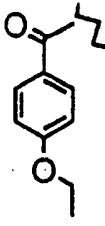
Sloučenina se rozpustí v ethylacetátu a hydrogenuje za použití 5% palladia na uhlí jako hydrogenačního katalyzátoru. Po odfiltrování hydrogenačního katalyzátoru se získaný produkt uvede v reakci s druhou karboxylovou kyselinou ( $R^2CO_2H$ , 1,5 ekv., což znamená množinu karboxylových kyselin tvořících zbytky vázající se k cílovému objektu [TBMs]), DIC (0,052 ml), 1,5 ekv.) a HOBt (0,051 g, 1,5 ekv.). Reakční směs se míchá po dobu celkem 8,5 hodiny při okolní teplotě. Reakční směs se potom zředí methylenchloridem a promyje 0,1 kyselinou chlorovodíkovou, nasyceným vodným roztokem hydrogenuhlíčitanu sodného a solankou. Organická vrstva se vysuší nad síranem sodným a zbylé rozpouštědlo se odežene za vakua. Získaný produkt se opětovně suspenduje v DCM, načež se přidá kyselina chlorovodíková při teplotě 0 °C a reakční směs se míchá po dobu 3 hodin. Po odpaření rozpouštědla se získá bílý pevný produkt, který se uvede v reakci s  $GdCl_3$  (4 ekv.) a NaOH (12 ekv.) k získání finálního produktu.

Seznam sloučenin syntetizovaných uvedeným způsobem je společně se strukturami prvního typu zbytků vázajících se k cílovému objektu (TBM1) a druhého typu zbytků vázajících se k cílovému objektu (TBM2) uveden v následující tabulce 4. Je třeba uvést, že  $R^1$  v obecném syntézním schematu odpovídá

prvnímu typu zbytku vázajícího se k cílovému objektu (TBM1), zatímco  $R^2$  zde odpovídá druhému typu zbytku vázajícího se k cílovému objektu (TBM2).

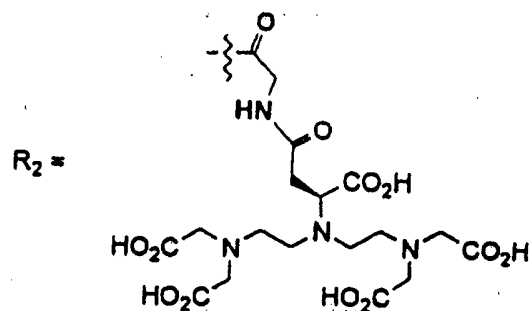
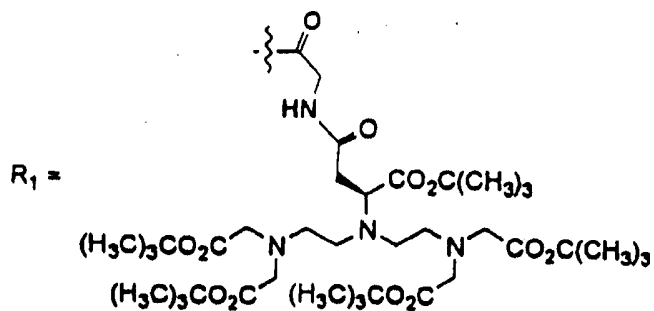
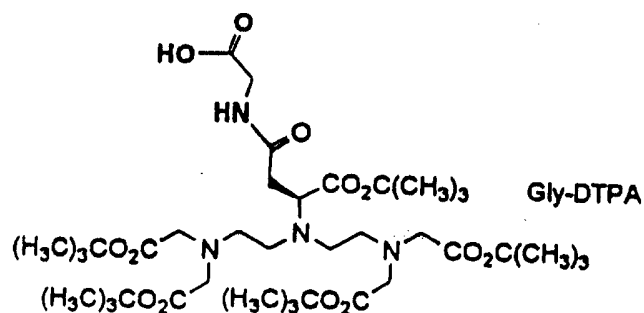
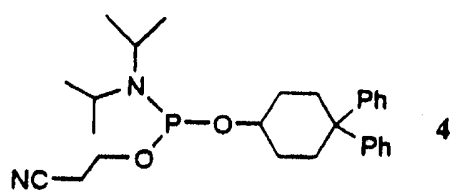
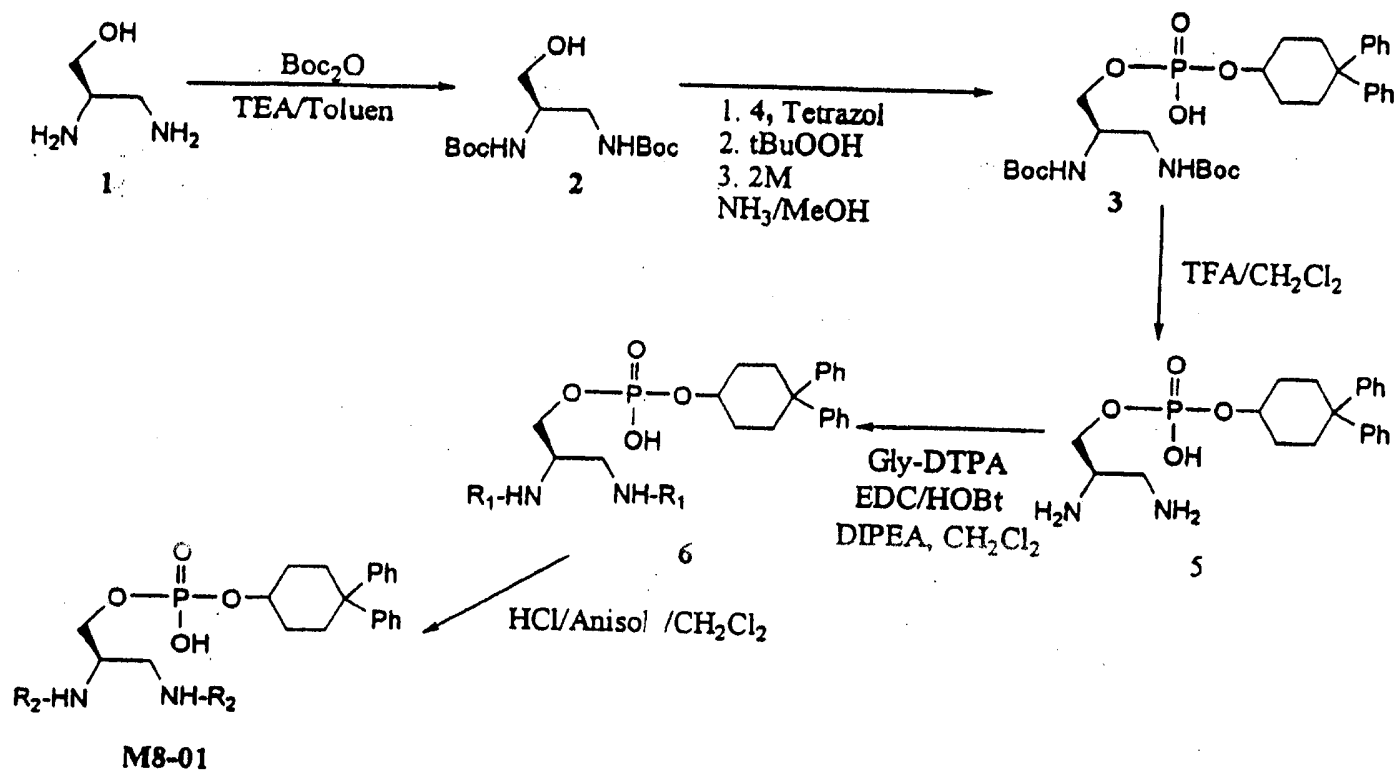
Tabulka 4

Multilokální kontrastní činidla se dvěma odlišnými zbytky vázajícími se k cílovému objektu (TBMs)

| Sloučenina | Chemická struktura TBM1 R<br>v obecném syntézním schématu                           | Chemická struktura TBM2 R<br>v obecném syntézním schématu                             |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| M8-20      |   |   |
| M8-21      |  |  |
| M8-22      |  |   |
| M8-23      |  |  |

## Příklad 9

## Syntéza kontrastního činidla M8-01

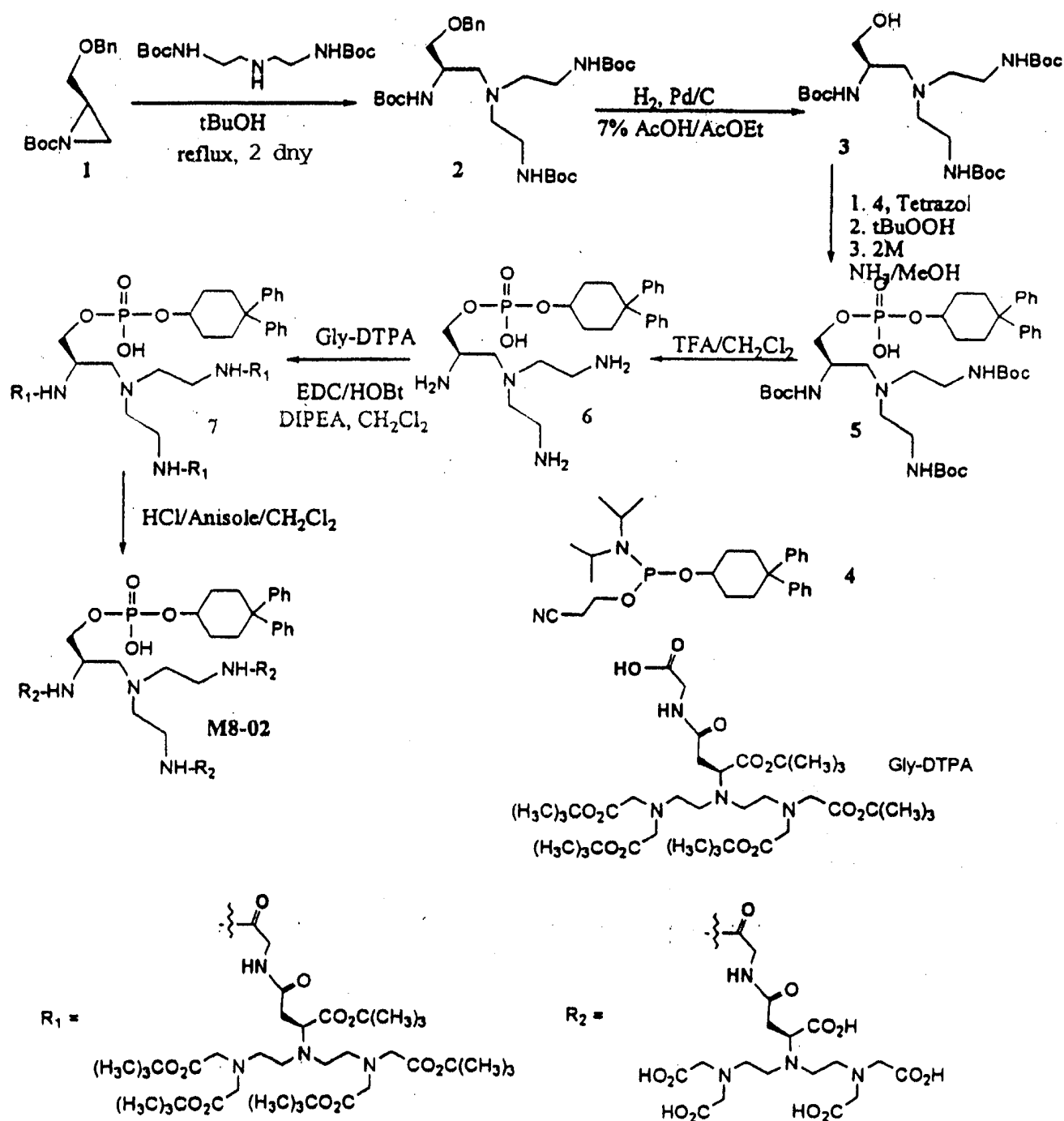


1,2-Di (Boc-amino)-3-hydroxypropan (1,0 ekv.) a difenylcyklohexylfosforamidit (1,1 ekv.) se rozpustí v tetrahydrofuranu (1,5 ml/mmol fosforamiditu) a získaný roztok se míchá s molekulárními síty po dobu 30 minut. Ke směsi se potom přidá tetrazol (1,2 ekv.) při okolní teplotě. Směs se míchá po dobu 45 minut, přičemž se ukončení reakce stanoví  $^{31}\text{P}$ - nukleární magnetickorezonanční spektroskopií. Ke směsi se potom přidá terc-butylhydroperoxid (1,2 ekv.). Reakční směs se míchá po dobu asi 1 hodiny, což je doba, po uplynutí které je pomocí  $^{31}\text{P}$ - nukleární magnetickorezonanční spektroskopie indikováno ukončení reakce. Vyloučená sraženina a molekulární síta se odstraní filtrací a k filtrátu se přidá methylenchlorid. Roztok se postupně promyje roztokem sirnatanu sodného, roztokem hydrogenuhličitanu sodného a nasyceným roztokem chloridu sodného a vysuší nad síranem sodným, zfiltruje a zahustí za vakua. K získanému světležlutému oleji se přidá 2M roztok amoniaku v methanolu. Směs se míchá přes noc, načež se rozpouštědlo odstraní za vakua. Reakční směs se přečistí chromatografií na sloupci silikagelu za použití chromatografické soustavy tvořené směsí ethylacetátu a methanolu, přičemž se získá fosfodiester.

Tento fosfodiester se zbaví ochranných skupin mícháním s kyselinou trifluoroctovou a methylenchloridem, načež se směs lyofilizuje k získání diamindifenylcyklohexylfosfodiesteru. Tento diamin se míchá přes noc vždy se 4 ekvivalenty Gly-DTPA-O-tBu, EDC a HOBt v methylenchloridu, ke kterému byl přidán diisopropylethylamin za účelem zvýšení pH. Zahuštěná reakční směs se potom přečistí preparativní vysoce výkonnou kapalinovou chromatografií s reverzní fází. Terc-butylesterové skupiny obou DTPA-jednotek se potom odštěpí mícháním se směsí obsahující kyselinu chlorovodíkovou, anisol a methylenchlorid v objemovém poměru 4:1:1 a následně se obvyklým způsobem

vytvoří s  $\text{GdCl}_3$  DTPA-gadoliniový chelát [viz například  
Lauffer R.B. a kol., Radiology 207: str. 529-38 (1998)] .

# Syntéza kontrastního činidla M8-02



Benzyloxymethylen-N-Boc-aziridin (2,82 g), připravený z N-Boc-O-benzylserinu, a N,N'-diBoc-diethylentriamin (3,9 g) se míchají v terc-butanolu při zahřívání k varu pod zpětným chladičem po dobu 2 hodin, načež se rozpouštědlo odežene za vakua a získaný zbytek se přečistí mžikovou chromatografií za použití chromatografické soustavy tvořené směsí methanolu a methylenchloridu, přičemž se získá 4,54 g produktu. Poměr Boc-vodíků k aromatickým vodíkům se ověří integrací  $^1\text{H}$ -nukleárního magnetickorezonančního spektra. Tento triBoc-chráněný tetraaminbenzylether (3,8 g) se rozpustí v 70 ml 7% roztoku kyseliny octové v ethylacetátu obsahujícím 1,0 g 10% palladia na uhlí. Nad reakční směs se potom zavede vodík o tlaku 0,34 MPa a směs se hydrogenuje po dobu 16 hodin. Rozpouštědlo se potom odežene z reakční směsi za vakua a zbytek se přečistí mžikovou chromatografií za použití chromatografické soustavy tvořené směsí methanolu a methylenchloridu, přičemž se získá 3,6 g produktu. Získaný alkohol a difenylcyklohexylfosforamidit se uvedou v reakci za výše uvedených podmínek (tetrazol, terc-butylhydroperoxid, amoniak v methanolu), přičemž se získá odpovídající fosfodiester.

Všechny tři skupiny Boc uvedeného fosfodiesteru (50 mg) se odstraní za míchání v 1,0 ml kyseliny trifluoroctové a 1 ml DCM po dobu 3 hodin, načež se směs lyofilizuje k získání 54 ml triaminu. Tento triamin se rozpustí v 1,0 ml methylenchloridu a získaný roztok se přidá po kapkách k roztoku obsahujícímu vždy 6 ekvivalentů Gly-DTPA-O-tBu, EDC a HOBt ve 2 ml methylenchloridu, ke kterému byla přidána DIEA za účelem nastavení pH na hodnotu 9,0. Koncentrovaná reakční směs se přečistí preparativní vysoce výkonnou kapalinovou chromatografií na sloupci C-4 při průtoku 20 ml/min chromatografické soustavy tvořené směsí acetonitrilu a vody v objemovém poměru 30:70 s gradientem k objemovému poměru 100:0 v průběhu 25 minut a potom při výdrži po dobu

10 minut. Molekulová hmotnost získané sloučeniny se ověří hmotovou spektroskopií. Terc-butylesterové skupiny DTPA-subjednotek se odštěpí k obnažení skupin karboxylových kyselin mícháním ve směsi kyseliny chlorovodíkové, anisolu a methylenchloridu v objemovém poměru 4:1:1 po dobu 5 hodin, načež se roztok zbaví rozpouštědla za vakua, zbytek se rozpustí ve vodě a lyofilizuje. DTPA-gadoliniové cheláty se potom snadno vytvoří reakcí s  $GdCl_3$  obvyklým způsobem [viz například Lauffer R.B. a kol., Radiology 207: str. 529-38 (1998)].



Benzylbromacetát (11 ml) v 50 ml acetonitrilu se přidá k N,N'-diBoc-diethylentriaminu (14 g) v 50 ml acetonitrilu a 19 ml triethylaminu a získaná směs se míchá po dobu 2 hodin, načež se rozpouštědlo odežene za vakua a zbytek se přečistí mžikovou chromatografií za použití chromatografické soustavy směsí hexanu a ethylacetátu k získání 11 g produktu. Obě ochranné skupiny Boc v této sloučenině se odstraní mícháním veškerého produktu ve směsi kyseliny trifluoroctové a methylenchloridu v objemovém poměru 1:1 po dobu 3 hodin, načež se roztok zbaví rozpouštědla za vakua, rozdělí mezi vodu a ether a lyofilizuje k získání 9,2 g produktu. Gly-DTPA-O-tBu, DIC a HOBt (vždy 2,2 ekvivalentu) se míchají v N,N-dimethylformamidu po dobu 45 minut a potom se tento triamin (1,0 g) jako bis(amoniumtrifluoracetát) rozpustí v N,N-dimethylformamidu a přidá do reakční nádoby, kde se pH nastaví na hodnotu 9,0 přidáním diisopropylethylaminu.

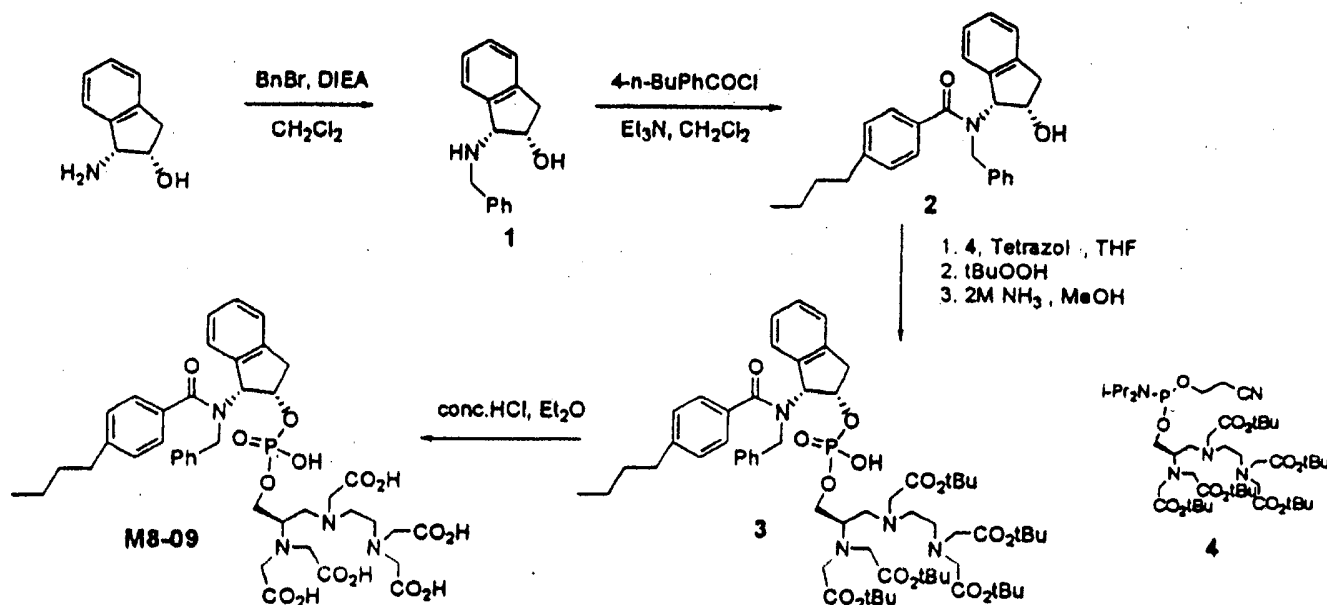
Po 12 hodinovém míchání se roztok zředí vodou a extrahuje ethylacetátem, který byl postupně promyt vodným roztokem kyseliny citronové, nasyceným vodným roztokem hydrogenuhlíčitanu sodného a nasyceným vodným roztokem chloridu sodného. Získaný ethylacetátový roztok se zahustí za vakua a zbytek po zahuštění se přečistí mžikovou chromatografií za použití chromatografické soustavy tvořené směsí hexanu a ethylacetátu k získání 845 mg produktu, jehož tetramerová chemická struktura je potvrzena hmotovou spektrometrií. Benzylová skupina se odstraní hydrogenací 800 mg tohoto produktu rozpuštěného v 10 ml hexanu, 9 ml methanolu a 1 ml triethylaminu v přítomnosti 20% palladia na uhlíku a vodíkové atmosféry. Směs se hydrogenuje po dobu 3 hodin, načež se hydrogenační směs zfiltruje přes celit a filtrát se zahustí za vakua. Tato karboxylová kyselina (750 mg) se míchá v methylenchloridu s EDC a HOBt (vždy 1,2 ekvivalentu) po dobu 30 minut a diamindifenylcyklohexylfos-

fodiester (80 mg), popsaný výše v rámci syntézy kontrastního činidla M8-01, se rozpustí v methylenchloridu a přidá k roztoku karboxylové kyseliny, načež se pH roztoku nastaví na hodnotu 9,0 přidáním diisopropylethylaminu. Po několika hodinách se směs zahustí a přečistí preparativní vysoce výkonnou kapalinovou chromatografií na sloupci C-4 při průtoku 20 ml/min chromatografické soustavy tvořené směsí acetonitrilu a vody v objemovém poměru 30:70 s gradientovým přechodem na objemový poměr 100:0 v průběhu 25 minut a následnou 10 minutovou výdrž k získání 150 mg produktu, jehož molekulová hmotnost byla ověřena hmotovou spektrometrií. Terc-butylesterové skupiny DTPA-podjednotek se odštěpí k obnažení skupin karboxylové kyseliny mícháním ve směsi kyseliny chlorovodíkové, anisolu a methylenchloridu v objemovém poměru 4:1:1 po dobu 5 hodin, načež se roztok zbaví rozpouštědla za vakua, zbytek se rozpustí ve vodě a lyofilizuje (výtěžek: 90 mg).

DTPA-gadoliniové cheláty se potom snadno připraví obvyklým způsobem reakcí s  $GdCl_3$  [viz například Lauffer R.B. a kol., Radiology 207: str. 529-38 (1998)].

## Příklad 12

## Syntéza kontrastního činidla M8-09



K suspenzi (1R-2S)-(+)-cis-1-amino-2-indanolu (15 g) v methylenchloridu (90 ml) se přidá diisopropylethylamin (35 ml) a potom benzylbromid (17,2 g). Získaná směs se míchá přes noc. Roztok se potom promyje vodou a dvakrát extrahuje 0,1N roztokem kyseliny chlorovodíkové, načež se pH sloučené vodné vrstvy zvýší na hodnotu 8 a vodná vrstva se čtyřikrát extrahuje methylenchloridem. Sloučená organická vrstva se promyje nasyceným roztokem chloridu sodného, vysuší nad síranem sodným, zfiltruje a zahustí k získání 1-benzylamino-2-indanolu (15,62 g), jehož molekulová hmotnost byla potvrzena hmotovou spektrometrií ( $m/e = 239,95$  pro  $\text{M}^+$ ). K roztoku 1-benzylamino-2-indanolu (10,5 g) a triethylaminu (9,2 ml) v methylenchloridu (250 ml) se po kapkách přidá 4-butylbenzoylchlorid (9,1 ml). Směs se míchá po dobu 4 hodin a potom se zahustí za vakua.

Získaný zbytek se rozpustí v ethylacetátu a promyje vodou, vysuší nad síranem sodným, zfiltruje, zahustí za vakua a přečistí mžikovou chromatografií za použití chromatografické soustavy tvořené směsí hexanu a ethylacetátu k získání 1-para-butylbenzoyl-1-benzylamino-2-indanolu (12,7 g).

$^1\text{H}$ -Nukleární magnetickorezonanční spektrum:

( $\text{CDCl}_3$ )

|          |                     |                    |                   |
|----------|---------------------|--------------------|-------------------|
| $\delta$ | 0,93 (t, 3H),       | 1,24-1,4 (m, 2H),  | 1,5-1,65 (m, 2H), |
|          | 2,6 (t, 2H),        | 2,8 (šir.d, 1H),   | 3,07 (dd, 1H),    |
|          | 4,52 (m, 1H),       | 4,65 (m, 2H),      | 5,13 (m, 1H),     |
|          | 7,09-7,32 (m, 11H), | 7,38-7,62 (m, 2H). |                   |

1-para-Butylbenzoyl-1-benzylamino-2-indanol (1,26 g) a DTPA-fosforamidit (2,99 g) se rozpustí v tetrahydrofuranu (5 ml) a získaný roztok se míchá s molekulárními síty po dobu 30 minut, načež se přidá tetrazol (265 mg) a získaná směs se míchá po dobu 45 minut.

Po ukončení reakce indikované  $^{31}\text{P}$ -nukleární magnetickorezonanční spektroskopií se ke směsi přidá terc-butylhydroperoxid (0,433 ml) a reakční směs se míchá po dobu 1 hodiny až do doby, kdy  $^{31}\text{P}$ -nukleární magnetickorezonanční spektrum indikuje ukončení reakce. Rezultující sraženina a molekulární síta se odstraní filtrací, načež se k filtrátu přidá methylenchlorid. Roztok se postupně promyje roztokem sirnatanu sodného, roztokem hydrogenuhlíčitanu sodného a nasyceným roztokem chloridu sodného, a vysuší nad síranem sodným, zfiltruje a zahustí za vakua. K rezultujícímu světležlutému oleji se přidá 2M roztok amoniaku v methanolu. Získaná směs se míchá přes noc, načež se rozpouštědlo odstraní za sníženého tlaku. Reakční směs se přečistí mžikovou chromatografií za použití chromatografické soustavy tvořené směsí ethylacetátu a

methanolu k získání fosfodiesterového aduktu ve formě bílého pevného produktu.

$^{31}\text{P}$ -Nukleární magnetickorezonanční spektrum:

(THF- $\text{d}^8$ )

$\delta$  -0,28;

hmotové spektrum LC-MC:

(m/e) 1165,75 ( $\text{M}^+$ ).

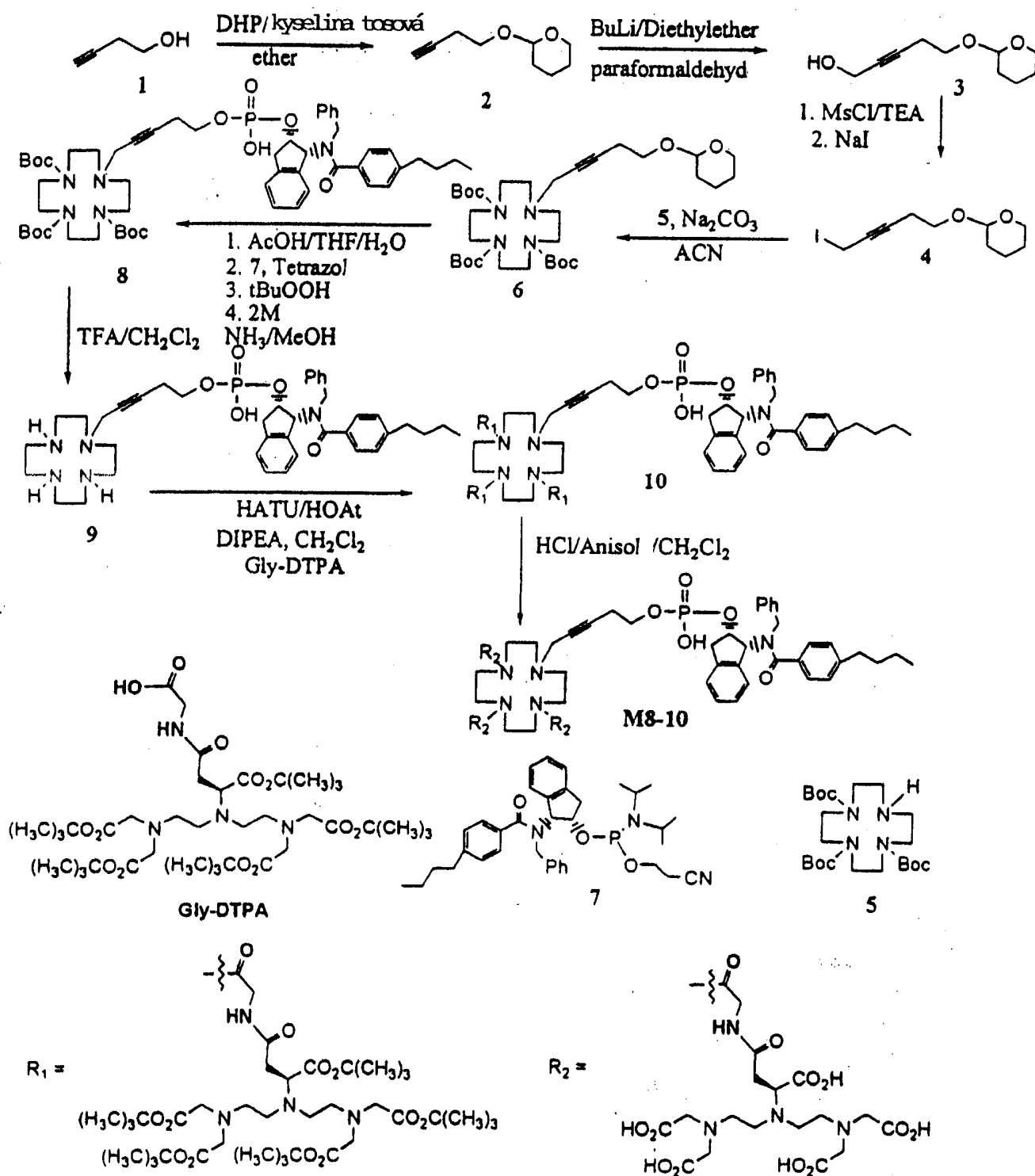
terc-Butylesterové skupiny DTPA-podjednotek se odštěpí k obnažení skupin karboxylové kyseliny rozpuštěním v methylenchloridu a působením 12N kyseliny chlorovodíkové. Po několika hodinách se pH nastaví na hodnotu 1,5 přidáním 5N vodného roztoku hydroxidu sodného a rezultující bílá sraženina se odfiltruje a dvaktát promyje roztokem kyseliny chlorovodíkové (k dosažení  $\text{pH} = 1,5$ ). Sraženina se lyofilizuje po dobu 48 hodin k získání produktu majícího formu jemného bílého prášku.

Hmotové spektrum LC-MS:

(m/e) 885,15 ( $\text{M}^+$ ).

DTPA-gadoliniové cheláty se snadno získají obvyklým způsobem reakcí s  $\text{GdCl}_3$  [viz například Lauffer R.B. a kol., Radiology 207: str.529-38 (1998)].

# Syntéza kontrastního činidla M8-10



3-Butin-1-ol (10 g) se míchá v etheru (250 ml) s 3,4-dihydropyranem (12 g) a kyselinou tosovou (tosic acid, 20 mg) po dobu 12 hodin, načež se roztok zahustí za vakua a zbytek po zahuštění se rozdělí mezi ethylacetát a vodu. Organický roztok se promyje nasyceným vodným roztokem chloridu sodného, vysuší nad síranem sodným a zahustí k získání DHP-chráněného alkoholu (18,7 g), který se použije bez další charakterizace a čistění. DHP-alkohol (18,7 g) se rozpustí v etheru (65 ml) a získaný roztok se ochladí na teplotu  $-75^{\circ}\text{C}$ , načež se k roztoku po kapkách přidá a při udržování uvedené teploty butyllithium (50,5 ml 2,0M roztoku) a potom paraformaldehyd (3,5 g). Po 4 hodinách se roztok ponechá ohřát na okolní teplotu a k takto ohřátému roztoku se přidá voda (100 ml). Vodná vrstva se odlije a organická vrstva se zahustí za vakua k získání oleje, který se přečistí mžikovou chromatografií za použití chromatografické soustavy tvořené směsí ethylacetátu a hexanu, přičemž se získá 5-THP-2-pentin-1,5-ol (13 g), jehož chemická struktura byla potvrzena  $^1\text{H}$ -nukleární magnetickorezonanční spektroskopií.

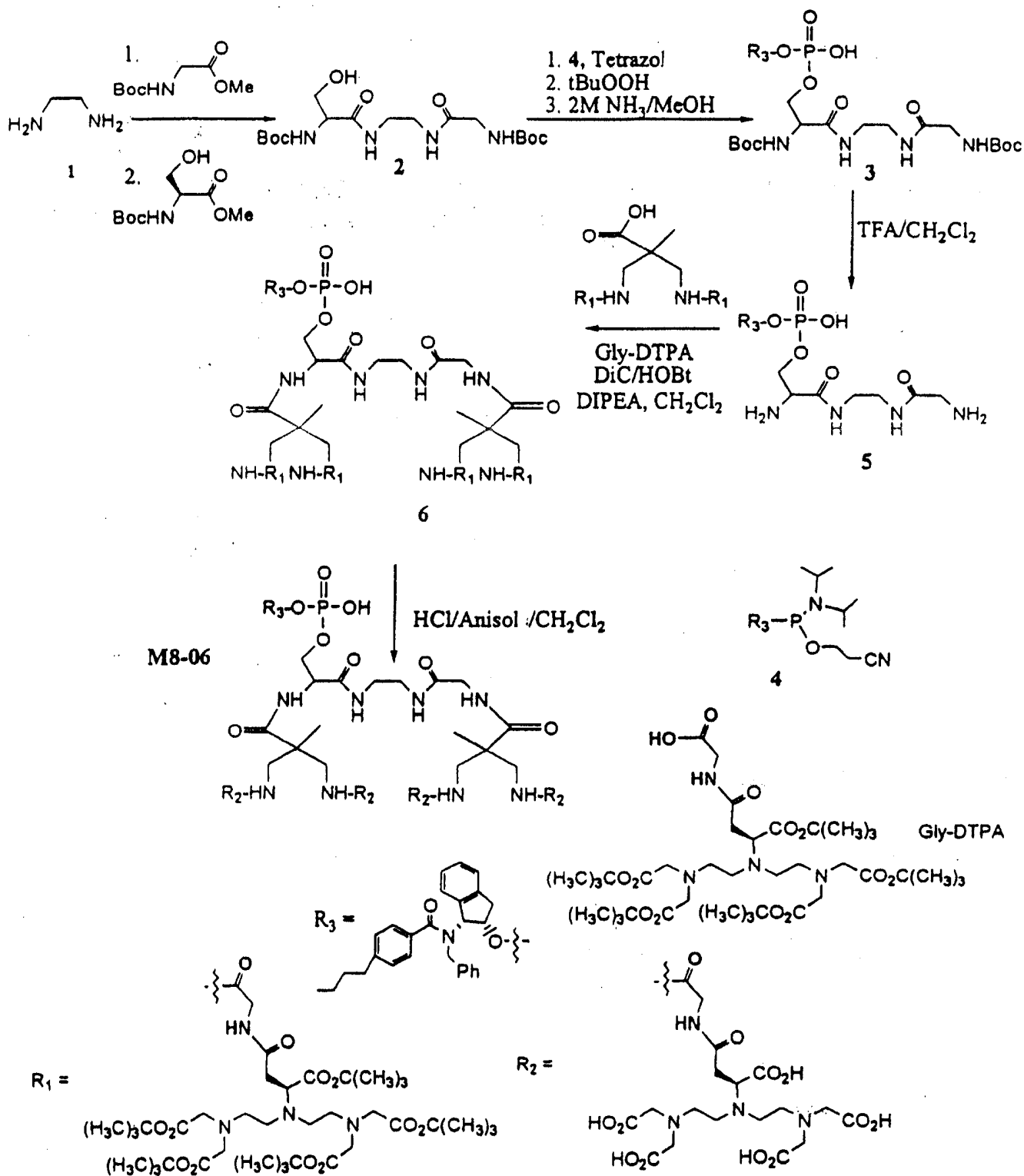
Alkinol (2,0 g) se nejdříve převede na mesylát (882 mg mesylchloridu, 1,6 ml triethylaminu, methylenchlorid) a potom na jodid (6,2 g jodidu sodného, bezvodý aceton) konvenčními postupy. Získaný jodalkin (1,2 g) se míchá s triBoc-cyklenem (200 mg) a uhličitanem sodným (200 mg) v 8 ml acetonitrilu po dobu 1,5 hodiny, načež se směs zbaví rozpouštědla zahuštěním za vakua a přečistěním mžikovou chromatografií za použití chromatografické soustavy tvořené směsí ethylacetátu a hexanu, a identita získaného aduktu (240 mg) se ověří  $^1\text{H}$ -nukleární magnetickorezonanční spektroskopií a hmotovou spektroskopií LC-MS. Uvedený adukt (240 mg) se následně zbaví ochranných skupin mícháním ve směsi kyseliny octové, tetrahydrofuranu a vody v objemovém poměru 4:2:1 (12 ml) při teplotě  $40^{\circ}\text{C}$  po dobu 6 hodin,

načež se reakční směs zředí vodou a ethylacetátem a organická vrstva se postupně extrahuje nasyceným vodným roztokem hydrogenuhličitanu sodného a roztokem chloridu sodného, vysuší nad síranem sodným a zahustí k získání alkoholu (250 mg). Fosfodiester tohoto alkoholu a 1-para-butylbenzoyl-1-benzylamino-2-indanolu se syntetizuje za použití metod standardní fosforamiditové chemie, které byly popsány výše v rámci syntézy kontrastního činidla M8-01 (tetrazol, terc-butylhydroperoxid, amoniak/methanol).

Všechny tři ochranné skupiny Boc na cyklu se odstraní působením kyseliny (kyselina trifluoroctová v methylenchloridu) a tři rezultující aminové skupiny se převedou na amidové skupiny působením Gly-DTPA-O-tBu za použití standardních postupů (HATU/HOAt, diisopropylethylamin, methylenchlorid), jak to již bylo popsáno výše. terc-Butylesterové skupiny DTPA-podjednotek se odštěpí k obnažení skupin karboxylové kyseliny mícháním ve směsi kyseliny chlorovodíkové, anisolu a methylenchloridu v objemovém poměru 4:1:1 po dobu 5 hodin, načež se roztok zbaví rozpouštědla za vakua, rozpustí ve vodě a lyofilizuje

DTPA-gadoliniové cheláty se potom snadno získají obvyklým způsobem reakcí s  $GdCl_3$  [viz například Lauffer R.B. a kol, Radiology 207: str.529-38 (1998)].

# Syntéza kontrastního činidla M8-06

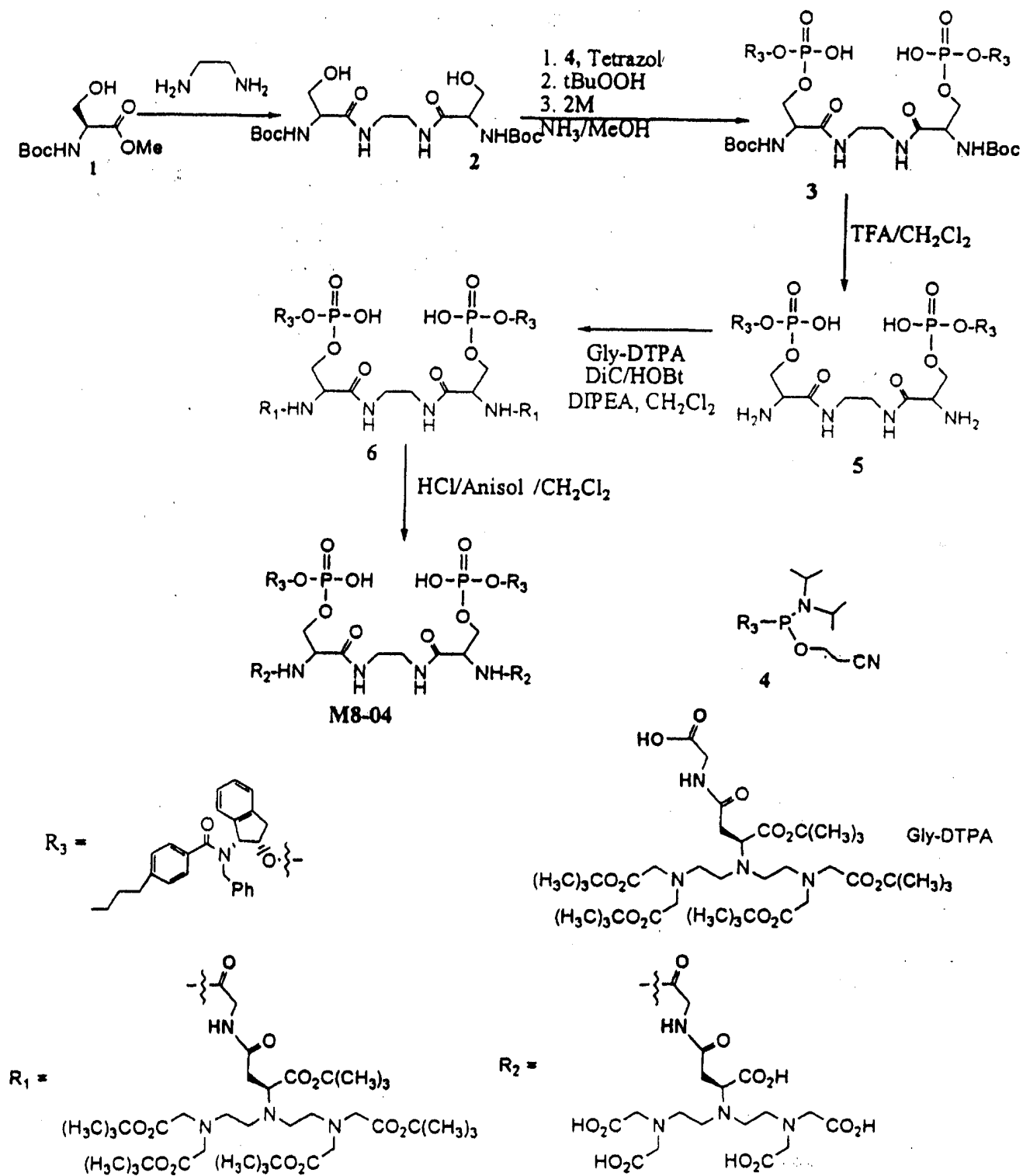


Ethylendiamin se postupně uvede v reakci s N-Boc-glycinmethylesterem a N-Boc-serinmethylesterem za vzniku diamidu. Volný alkohol a 1-parabutylbenzoyl-1-benzylamino-2-indanol se převedou na fosfodiester výše diskutovaným způsobem (tetrazol, terc.butylhydroperoxid, amoniak/methanol). Benzyl-(3-amino-2-aminomethyl-2-methyl)-propanoát a dva ekvivalenty Gly-DTPA-O-tBu se uvedou v reakci za použití výše popsaných podmínek (DIC/HOBt, diisopropylethylamin, methylenchlorid) za vzniku odpovídajícího diaminu. Dva ekvivalenty tohoto diamidu se uvedou v reakci s ethylendiaminovým derivátem za vzniku tetrameru. terc-Butylesterové skupiny DTPA-podjednotek se odštěpí k uvolnění skupin karboxylové kyseliny mícháním ve směsi kyseliny chlorovodíkové, anisolu a methylenchloridu v poměru 4:1:1 po dobu 5 hodin, načež se roztok zbaví rozpouštědla za vakua, zbytek se rozpustí ve vodě a lyofilizuje.

DTPA-gadoliniové cheláty se znadno získají obvyklým způsobem reakcí s  $GdCl_3$  [viz například Lauffer R.B. a kol., Radiology 207: str. 529-38 (1998)].

## Příklad 15

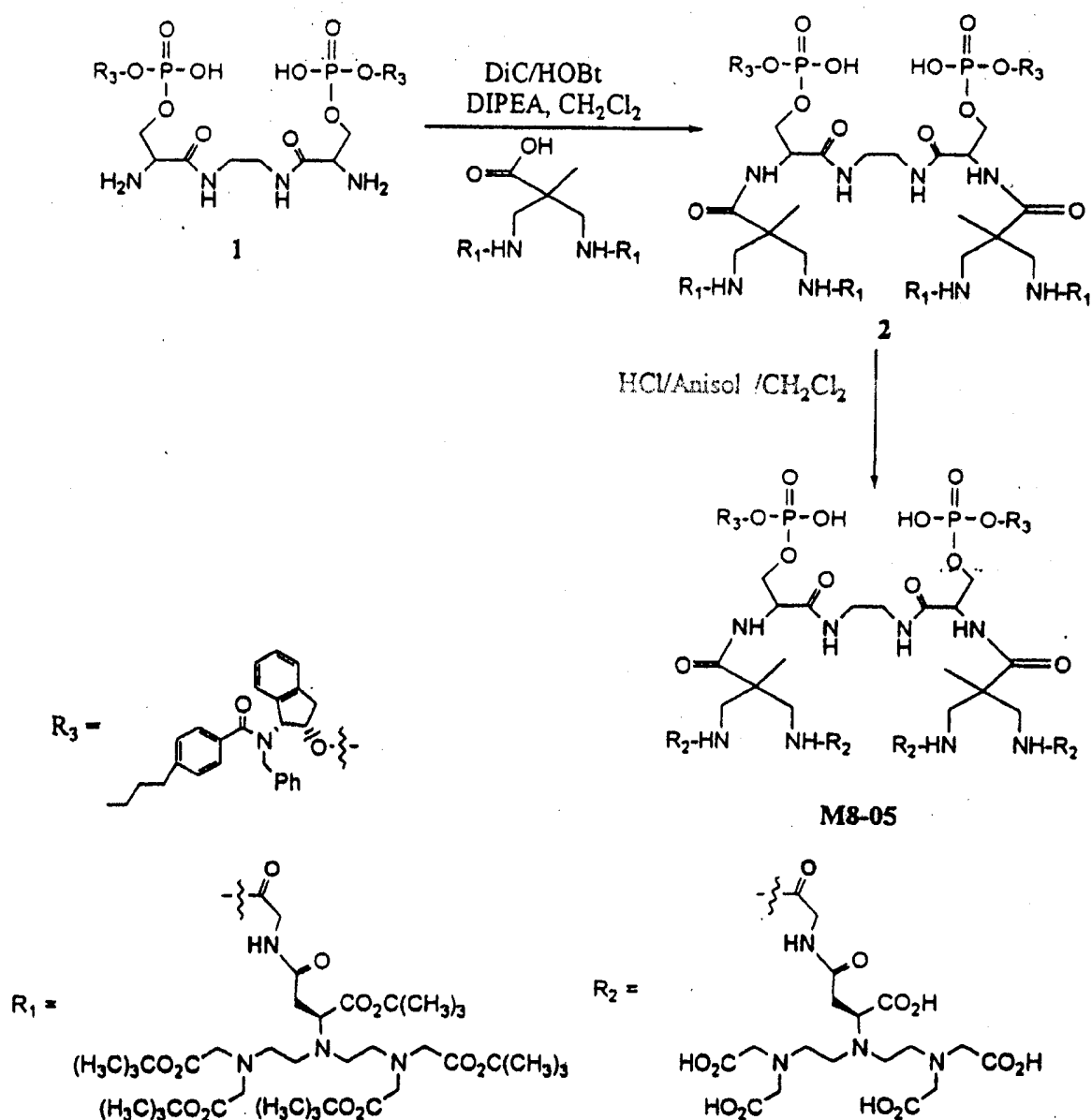
## Syntéza kontrastního činidla M8-04



Ethylendiamin a dva ekvivalenty N-Boc-serinmethylesteru se uvedou v reakci za vzniku diamidu. Tento diamid se dále uvede v reakci za vzniku výše zobrazeného difosfátového derivátu. Zbytky vázající se k cílovému objektu (TBMs) se připojí a zbaví ochranných skupin za použití postupů popsaných výše v rámci příkladu 14.

## Příklad 16

## Syntéza kontrastního činidla M8-05

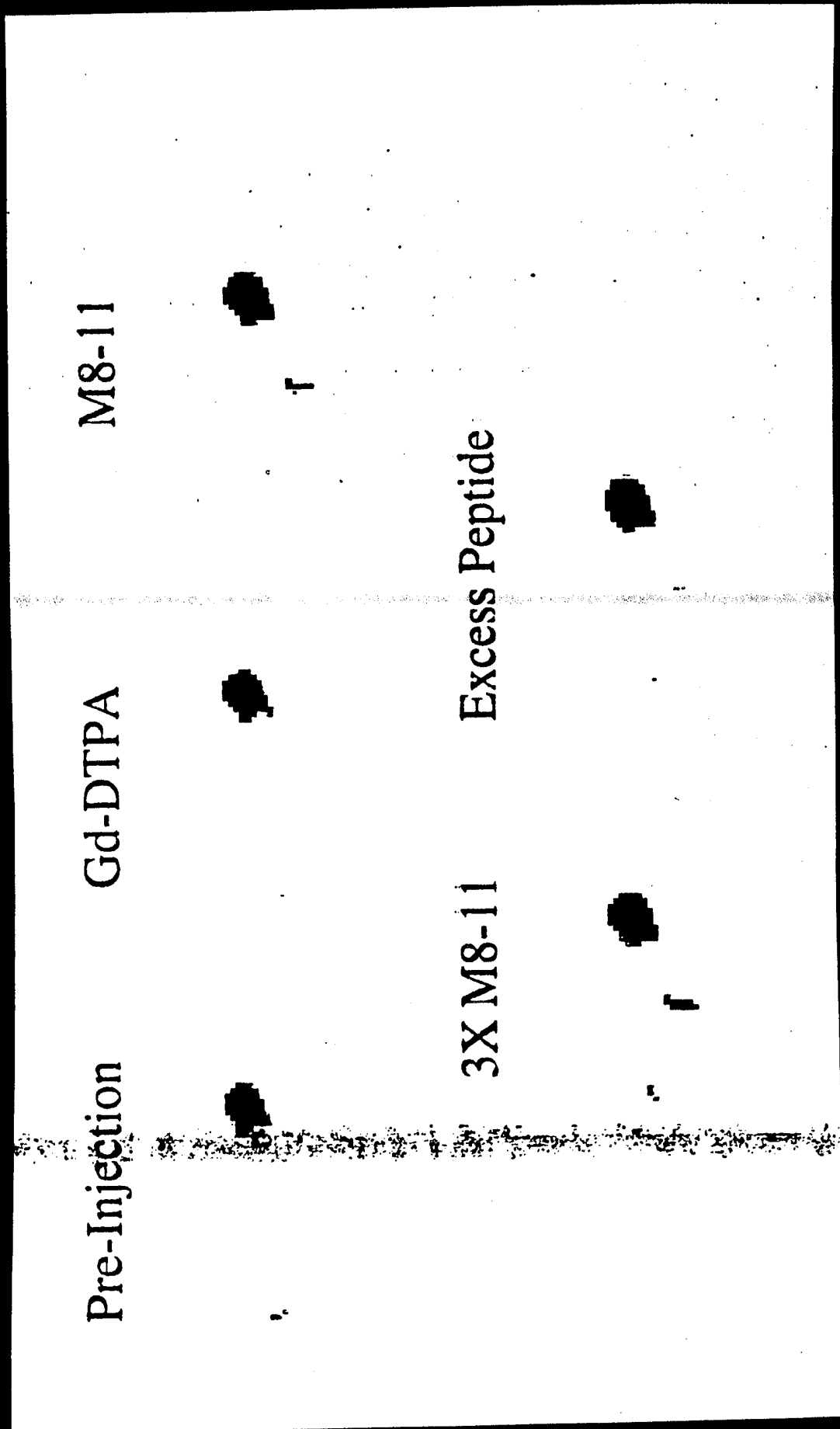


Difosfátový derivát diamidu použitý jako výchozí produkt při této syntéze je stejný jako meziproduct získaný v rámci syntézy kontrastního činidla M8-04 popsané v příkladu 15. Zbytky vázající se k cílovému objektu (TBMs) se připojí a zbaví ochranných skupin za použití postupů popsaných výše v rámci příkladu 14.

#### Příklad 16

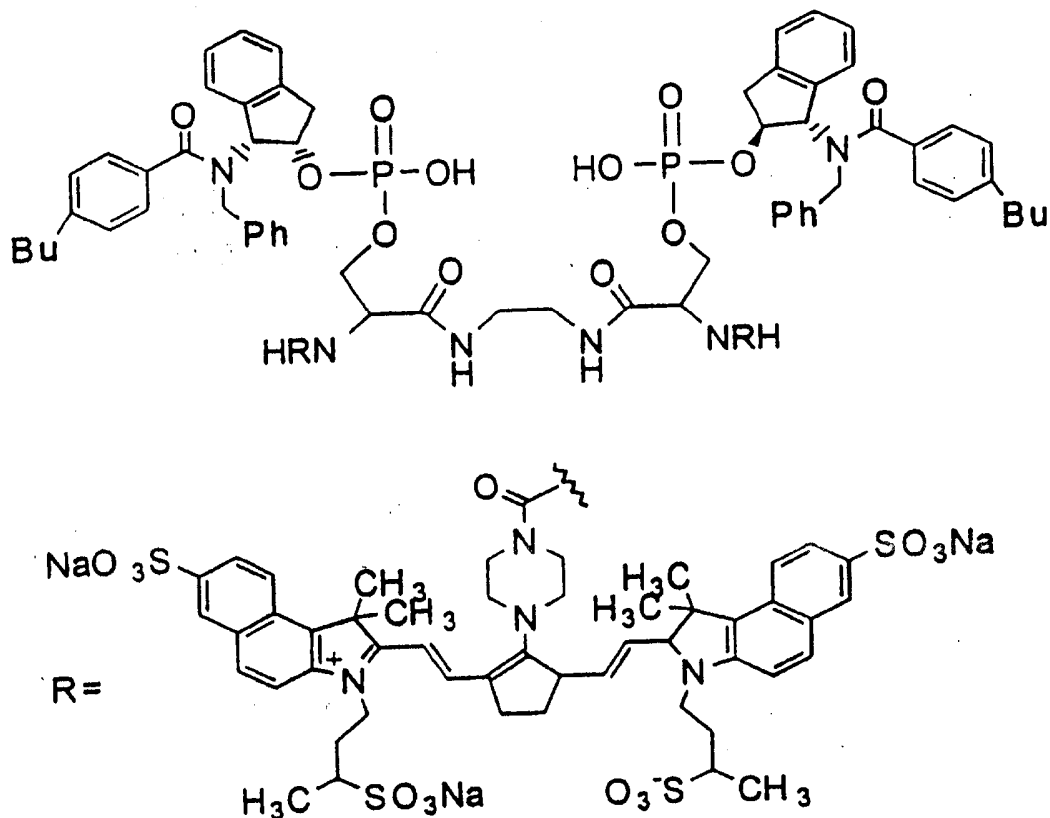
Vazba M8-11 měřená v rámci modelu s králičí hrdeční žílou (1,5 T; SPGR 36/5/30 deg.)

Následující obr.15 představuje fotografii obrazů získaných při experimentu využívajícím stanovení popsané v příkladu 1. Tento experiment ukazuje obrazy před injekcí ["Pre-injection"], po injekci kontrolní necílené Gd-DTPA-sloučeniny ["Gd-DTPA"], po injekci s kontrastním činidlem M8-11 ["M8-11"] popsaným v příkladu 3, po injekci trojnásobné dávky kontrastního činidla M8-11 ["3X M8-11"] a po injekci nadbytku peptidu majícího aminokyselinovou sekvenci (uvedenou v jednopísmenovém formátu) LPCDYGTCLD ["Excess Peptide"], který konkuruje se zbytky vázajícími se k cílovému formátu (TBMs) kontrastního činidla při obsazování vazebných míst na cílovém objektu. Krevní sraženina je specificky zobrazena kontrastním činidlem M8-11, poněvadž kontrastní činidlo postrádající zbytek vázající se k cílovému objektu (TBM) se neváže a poněvadž vazba je reverzována v přítomnosti nadbytku peptidu.



## Příklad 16

Infračervené oblasti blízké opticky zobrazující činidlo

**M8-24**

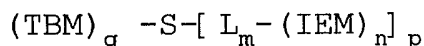
Infračervené oblasti blízké fluorescenčně zobrazující činidlo M8-24 obsahuje zbytek zlepšující obraz (IEM) vhodný pro optické zobrazení ("R"). Toto činidlo se připraví z odpovídajícího derivátu karboxylové kyseliny fluorescenčního barviva (viz WO 2000/16810). Uvedený derivát karboxylové kyseliny se připojí k difosfátovému derivátu diaminu za podmínek syntetického stupně popsaného v příkladu 13. V příkladu 13 je analogickým stupněm připojení Gly-DTPA-TBM k difosfátovému derivátu diaminu za vzniku M8-04. Toto infračervené kontrastní činidlo cílené na albumin se použije například při oftalmologické

angiografii a při diagnóze rakovin kůže. Výše zobrazené optické kontrastní činidlo může být použito v rámci libovolné z aplikací, jejichž výčet byl uveden pro činidla určená pro magnetickorezonanční zobrazení krevního řečiště. Kromě toho je pro odborníka v daném oboru zřejmé, že zbytky zlepšující obraz takového optického zobrazovacího činidla mohou být měněny substitucí různými deriváty karboxylové kyseliny barviva. Takové zobrazovací činidlo může být takto modifikováno tak, aby odpovídalo specifickým experimentálním kritériím, mezi které patří například specifická excitační vlnová délka.

## P A T E N T O V É      N Á R O K Y

1. Multilokální cílené kontrastní činidlo pro magneticko-rezonanční zobrazení, v y z n a č e n é t í m, že obsahuje lešení, alespoň dva zbytky vázající se k cílovému objektu (TBMs) kovalentně vázané k různým atomům lešení, alespoň dva zbytky zlepšující obraz (IEMs), přičemž každý z uvedených zbytků zlepšujících obraz je buď kovalentně vázán k lešení nebo kovalentně vázán k mezilehlému linkeru, který je zase kovalentně vázán k lešení, každý zbytek zlepšující obraz (IEM) obsahuje chelát paramagnetického kovového iontu nebo optické barvivo, každý zbytek vázající se k cílovému objektu (TBM) je buď kovalentně vázán k atomům lešení nebo k linkeru a každý zbytek vázající se k cílovému objektu (TBM) má afinitu k cílovému objektu.

2. Multilokální cílené kontrastní činidlo podle nároku 1, v y z n a č e n é t í m, že má obecný vzorec



ve kterém

TBM znamená zbytek vázající se k cílovému objektu,

S znamená lešení,

L znamená linker,

IEM znamená zbytek zlepšující obraz a

q, m, n a p nezávisle na sobě znamenají celá čísla, přičemž

q znamená celé číslo od 2 do 6 včetně,

každý m nezávisle znamená 0 nebo 1,

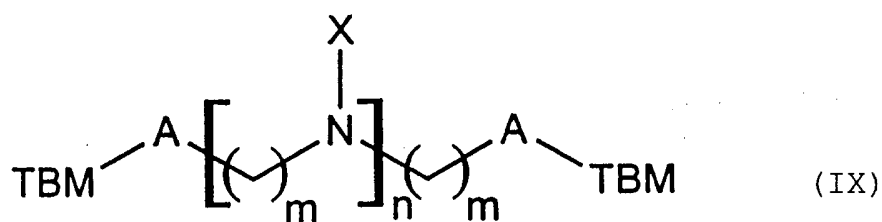
každý n nezávisle znamená celé číslo od 2 do 4 včetně,

p znamená celé číslo od 2 do 4 včetně a

každý TBM je kovalentně vázán k S přímou chemickou vazbou,  
 každý L, je-li přítomen, je kovalentně vázán k alespoň  
 jednomu IEM přímou chemickou vazbou,  
 každý L, je-li přítomen, je kovalentně vázán k S přímou  
 chemickou vazbou a  
 alespoň dva TBMs jsou připojeny k různým atomům lešení.

3. Multilokální cílené kontrastní činidlo podle nároku 1  
 nebo 2, v y z n a č e n é t í m, že lešením je  
 oligoalkylenamin, zbytky zobrazující obraz (IEMs) jsou  
 odvozeny od diethylentriaminu nebo tetraazacyklododekanu a  
 mají  $K_f$  rovnou alespoň  $10^{15} \text{ M}^{-1}$ , zbytky vázající se k  
 cílovému objektu (TBMs) obsahují peptid a jsou kovalentně  
 vázány k atomům dusíku lešení a každý ze zbytků  
 zlepšujících obraz (IEMs) je buď přímo nebo prostřednictvím  
 linkeru kovalentně vázán k jiným atomům dusíku lešení, než  
 ke kterým jsou vázány zbytky vázající se k cílovému  
 objektu (TBMs).

4. Multilokální cílené kontrastní činidlo podle nároku 3,  
 v y z n a č e n é t í m, že má strukturu obecného vzorce  
 IX

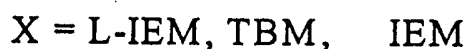
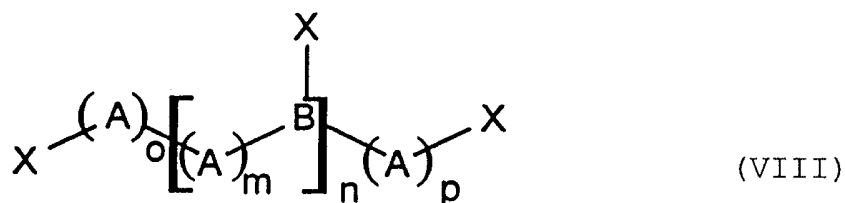


ve kterém

každý m nezávisle znamená celé číslo od 1 do 8 včetně,  
 každý A je nezávisle zvolen z množiny zahrnující O,  $\text{CH}_2$ ,  
 $\text{C=O}$ ,  $\text{C=NH}$ , NH, NR a CHR,

R znamená přímou nebo rozvětvenou alkylovou skupinu obsahující 1 až 10 uhlíkových atomů, přímou nebo rozvětvenou alkenylovou nebo alkinylovou skupinu obsahující 2 až 10 uhlíkových atomů, přičemž až čtyři uhlíkové atomy jsou případně substituovány atomem halogenu, atomem kyslíku, atomem dusíku nebo atomem síry, a n znamená celé číslo od 2 do 10 včetně.

5. Multilokální cílené kontrastní činidlo podle nároku 2, v y z n a č e n é t í m, že má strukturu obecného vzorce VIII



ve kterém

m znamená celé číslo od 1 do 10 včetně,

n znamená celé číslo od 2 do 10 včetně,

o znamená 0 nebo 1,

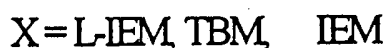
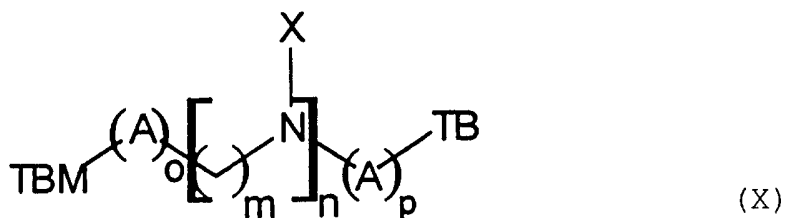
p znamená 0 nebo 1,

každý A je nezávisle zvolen z množiny zahrnující O, CH<sub>2</sub>, C=O, C=NH, NH, NR a CHR,

každý B je nezávisle zvolen z množiny zahrnující CH a N a

R znamená přímou nebo rozvětvenou alkylovou skupinu obsahující 1 až 10 uhlíkových atomů, přímou nebo rozvětvenou alkenylovou nebo alkinylovou skupinu obsahující 2 až 10 uhlíkových atomů, přičemž až čtyři uhlíkové atomy jsou případně substituovány atomem halogenu, atomem kyslíku, atomem dusíku nebo atomem síry.

6. Multilokální cílené kontrastní činidlo podle nároku 5, v y z n a č e n é t í m, že má strukturu obecného vzorce X



ve kterém

m znamená celé číslo od 1 do 10 včetně,

n znamená celé číslo od 2 do 10 včetně,

o znamená 0 nebo 1,

p znamená 0 nebo 1,

každý A je nezávisle zvolen z množiny zahrnující O, CH<sub>2</sub>, C=O, C=NH, NH, NR a CHR,

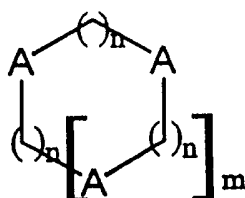
B je zvolen z množiny zahrnující CH a N a

R znamená přímou nebo rozvětvenou alkylovou skupinu obsahující 1 až 10 uhlíkových atomů, přímou nebo rozvětvenou alkenylovou nebo alkinylovou skupinu obsahující 2 až 10 uhlíkových atomů, přičemž až čtyři uhlíkové atomy jsou případně substituovány atomem halogenu, atomem kyslíku, atomem dusíku nebo atomem síry.

7. Multilokální cílené kontrastní činidlo podle nároku 2, v y z n a č e n é t í m, že obsahuje

- dva nebo více zbytků zlepšujících obraz (IEMs),
- dva nebo více zbytků vázajících se k cílovému objektu (TBMs),
- lešení, ke kterému jsou připojeny zbytky vázající se k cílovému objektu (TBMs) a zbytky zlepšující obraz (IEMs), a

d) případné linkery pro připojení zbytků zlepšujících obraz (IEMs) k lešení, přičemž lešení obsahuje strukturu obecného vzorce XII



(XII)

ve kterém

$m$  a  $n$  nezávisle jeden na druhém znamenají celá čísla, kde

m znamená celé číslo od 0 do 3 včetně,

$n$  znamená celé číslo od 0 do 2 včetně,

každý A je nezávisle zvolen z množiny zahrnující NH, NR, O, S, CH<sub>2</sub>, C=O, C=NH, C=NR a CHR, kde

R znamená přímou nebo rozvětvenou alkylovou skupinu obsahující 1 až 10 uhlíkových atomů, přímou nebo rozvětvenou alkenylovou nebo alkinylovou skupinu obsahující 2 až 10 uhlíkových atomů, přičemž až čtyři uhlíkové atomy jsou případně substituovány atomem halogenu, atomem kyslíku, atomem dusíku nebo atomem síry.

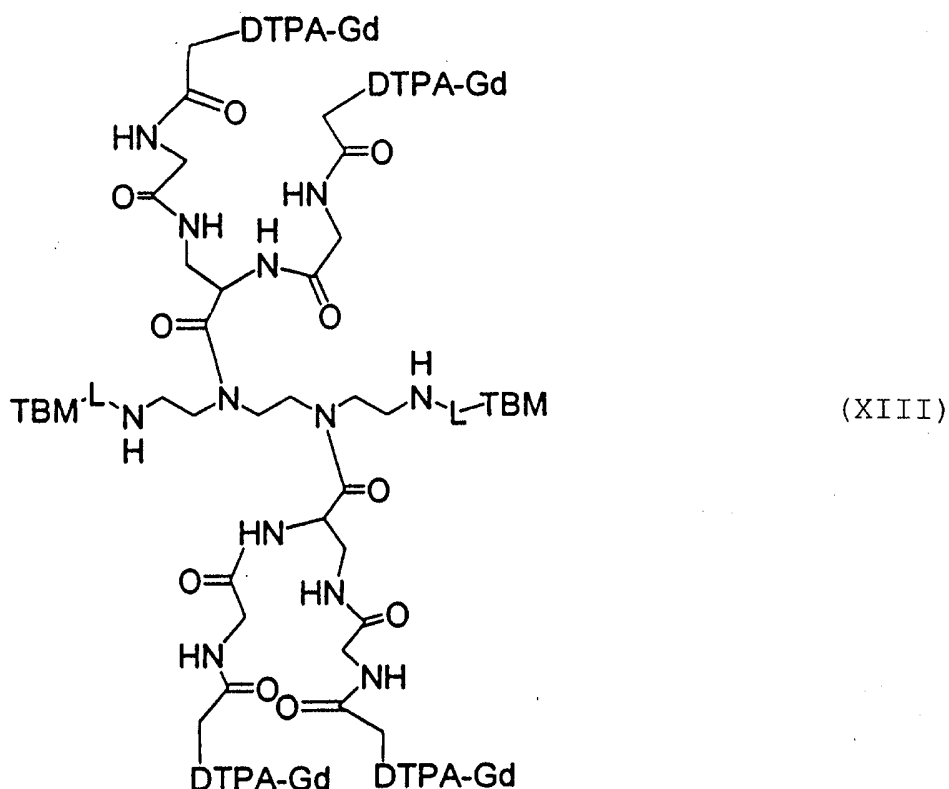
8. Multilokální cílené kontrastní činidlo podle nároku 4, 5, 6 nebo 7, v y z n a č e n é t í m, že A znamená C=O nebo O.

9. Multilokální cílené kontrastní činidlo podle nároku 4, 5, 6 nebo 7, v y z n a č e n é t í m, že zbytek vázající se k cílovému objektu (TBM) obsahuje peptid, přičemž uvedený peptid má afinitu pro trombus, fibrin nebo jejich rozpustné fragmenty.

10. Multilokální cílené kontrastní činidlo podle nároku 4, 5, 6 nebo 7, v y z n a č e n é t í m, že zbytek zlepšující obraz (IEM) je zvolen z množiny zahrnující cheláty paramagnetických kovových iontů a derivátů diethylentriaminu a tetraazacyklododekanu, přičemž každý chelát má  $K_f$  alespoň rovnou  $10^{15} \text{ M}^{-1}$ .

11. Multilokální cílené kontrastní činidlo podle nároku 10, v y z n a č e n ý t í m, že zbytkem zlepšujícím obraz (IEM) je chelát kyseliny diethylentriaminpentaoctové a paramagnetického kovového iontu.

12. Multilokální cílené kontrastní činidlo, v y z n a č e n é t í m, že má strukturu obecného vzorce XIII



ve kterém zbytkem vázajícím se k cílovému objektu (TBM) je peptid.

13. Způsob diagnostického lékařského zobrazení cílového objektu, v y z n a č e n ý t í m, že se

- a) podá kontrastní činidlo podle nároku 1,
- b) toto kontrastní činidlo se ponechá navázat k cílovému objektu a
- c) cíloví objekt se zobrazí v přítomnosti kontrastního činidla.

14. Způsob magnetickorezonančního zobrazení cílového objektu podle nároku 1, v y z n a č e n ý t í m, že každý zbytek zlepšující obraz (IEM) obsahuje chelát iontu paramagnetického kovu a relaxivita kontrastního činidla v přítomnosti cílového objektu je alespoň dvakrát větší než jeho relaxivita v nepřítomnosti cílového objektu.

15. Způsob magnetickorezonančního zobrazení podle nároku 14, v y z n a č e n ý t í m, že relaxivita v přítomnosti cílového objektu je alespoň rovna  $10 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ , vztaženo na jeden zbytek zlepšující obraz (IEM).

16. Způsob magnetickorezonančního zobrazení podle nároku 14, v y z n a č e n ý t í m, že relaxivita v přítomnosti cílového objektu je alespoň rovna  $15 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ , vztaženo na jeden zbytek zlepšující obraz.

17. Způsob magnetickorezonančního zobrazení podle nároku 14, v y z n a č e n ý t í m, že relaxivita v přítomnosti cílového objektu je alespoň rovna  $20 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ , vztaženo na jeden zbytek zlepšující obraz.

18. Způsob magnetickorezonančního zobrazení podle nároku 14, v y z n a č e n ý t í m, že relaxivita v přítomnosti cílového objektu je alespoň rovna  $25 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ , vztaženo na jeden zbytek zlepšující obraz.

19. Způsob magnetickorezonančního zobrazení podle nároku 14, v y z n a č e n ý t í m, že relaxivita v přítomnosti cílového objektu je alespoň rovna  $30 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ , vztaženo na jeden zbytek zlepšující obraz.

20. Způsob magnetickorezonančního zobrazení cílového objektu podle nároku 1 nebo 2, v y z n a č e n ý t í m, že cílovým objektem je protein, polysacharid, buňka, tekutina, glykoprotein nebo trombus a kontrastní činidlo se podává lidskému nebo zvířecímu pacientovi injekcí.

Zastupuje: