



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(51) МПК
C07C 231/00 (2006.01)
C07C 237/04 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2004127136/04, 16.12.1999

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
16.12.1999

(30) Конвенционный приоритет:
23.12.1998 IT MI98A002802

(43) Дата публикации заявки: 27.02.2006

(45) Опубликовано: 27.07.2010 Бюл. № 21

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: WO 95/32741 A, 07.12.1995. Y.S.Lee et al. «Chiral synthesis of trans-1-Aminoindolo[2,3- α]quinolizidine and trans-1-Aminobenzol[α]quinolizidine Derivatives from L-Pyrogutamic Acid», The Journal of Organic Chemistry 1999, 64 (26), p.9727-9730. C.M.Acevedo et al. Synthesis and analysis of the sterically constrained L-glutamine (см. прод.)

(62) Номер и дата подачи первоначальной заявки, из которой данная заявка выделена:
2001120351 16.12.1999

Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры", пат.пов. Е.Е.Назиной

(72) Автор(ы):

АНЕЛЛИ Пьер Лучио (IT),
БРОККЕТТА Марино (IT),
ДЕ ХАЕН Кристоф (IT),
ГАЦЦОТТИ Орнелла (IT),
ЛАТТУАДА Лучано (IT),
ЛУКС Джованна (IT),
МАНФРЕДИ Джузеппе (IT),
МОРОЗИНИ Пьерфранческо (IT),
ПАЛАНО Даниела (IT),
СЕРЛЕТИ Микеле (IT),
УГГЕРИ Фульвио (IT),
ВИЗИГАЛЛИ Массимо (IT)

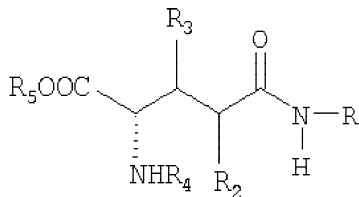
(73) Патентообладатель(и):

БРАККО ИМЭДЖИНГ С.П.А. (IT)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ГАММА-АМИДОВ ГЛУТАМОВОЙ КИСЛОТЫ

(57) Реферат:

Изобретение касается способа получения γ -амидов глутамовой кислоты формулы



где R_4 представляет аминокзащитную группу, выбранную из карбобензилоксигруппы (CBz), R_5 представляет неразветвленный или

разветвленный C_1 - C_{10} алкил, R_2 и R_3 независимо представляют атом водорода, R - NH_2 представляет собой 3-аминопроизводное желчной кислоты, которые далее способны реагировать с образованием ценных органических соединений-лигандов, комплексы которых с ионами парамагнитных двух-трех-валентных металлов, выбранных из группы, состоящей из $Fe^{(2+)}$, $Fe^{(3+)}$, $Cu^{(2+)}$, $Cr^{(3+)}$, $Gd^{(3+)}$, $Eu^{(3+)}$, $Dy^{(3+)}$, $Yb^{(3+)}$ или $Mn^{(2+)}$, могут служить основой для получения диагностических композиций для применения в ЯМР-томографии кровеносной системы

организмов человека и животных. 1 табл., 4 ил.

(5б) (продолжение):

analogues (3S,4R)-3,4-dimethyl-L-glutamine and (3S,4R)-3,4-dimethyl-L-pyroglutamic acid, TETRAHEDRON 2001, 57, p.6353-6359. EP 0279307 A, 24.08.1988. RU 2059642 C1, 10.05.1996. WO 95/19186 A, 20.07.1995.

R U 2 3 9 5 4 9 0 C 2

R U 2 3 9 5 4 9 0 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.
C07C 231/00 (2006.01)
C07C 237/04 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21), (22) Application: **2004127136/04**, **16.12.1999**

(24) Effective date for property rights:
16.12.1999

(30) Priority:
23.12.1998 IT MI98A002802

(43) Application published: **27.02.2006**

(45) Date of publication: **27.07.2010 Bull. 21**

(62) Number and date of filing of the initial application, from which the given application is allocated: **2001120351 16.12.1999**

Mail address:
129090, Moskva, ul. B.Spaskaja, 25, str.3, OOO "Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery", pat.pov. E.E.Nazinoj

(72) Inventor(s):

**ANELLI P'er Luchio (IT),
BROKKETTA Marino (IT),
DE KhaEN Kristof (IT),
GATsTsOTTI Ornella (IT),
LATTUADA Luchano (IT),
LUKS Dzhovanna (IT),
MANFREDI Dzhuzeppe (IT),
MOROZINI P'erfranchesko (IT),
PALANO Daniela (IT),
SERLETI Mikele (IT),
UGGERI Ful'vio (IT),
VIZIGALLI Massimo (IT)**

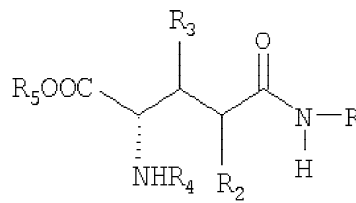
(73) Proprietor(s):

BRAKKO IMEhDZhING S.P.A. (IT)

(54) METHOD OF PRODUCING GAMMA AMIDES OF GLUTAMIC ACID

(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: invention relates to a method of producing γ -amides of glutamic acid of formula  , where R₄ is

an amino-protective group selected from a carbobenzyloxy group (CBz), R₅ is a straight or branched C₁-C₁₀alkyl, R₂ and R₃ independently

represent a hydrogen atom, R-NH₂ is a 3-amino-derivative of bile acid, which are further capable of reacting to form valuable organic compounds - ligands, complexes with ions of paramagnetic di-trivalent metals selected from a group consisting of Fe⁽²⁺⁾, Fe⁽³⁺⁾, Cu⁽²⁺⁾, Cr⁽³⁺⁾, Gd⁽³⁺⁾, Eu⁽³⁺⁾, Dy⁽³⁺⁾, Yb⁽³⁺⁾ or Mn⁽²⁺⁾ of which can serve as a base for preparing diagnostic compositions for use in NMR-tomography of the blood circulatory system of humans and animals.

EFFECT: design of an efficient method of producing γ -amides of glutamic acid.

1 cl, 20 ex

Настоящее изобретение относится к способу получения γ -амидов глутаминовой кислоты, которые являются промежуточными соединениями в синтезе комплексов ионов металлов конъюгатов желчных кислот с молекулами, обладающими хелатирующей активностью. Указанные комплексы могут найти применение в качестве контрастных агентов для применения в способах диагностики, известных как «ЯМР-томография», в частности в качестве агентов для кровяного депо.

Комплексы, образованные хелатирующими агентами и подходящими металлами, уже используют в качестве контрастных агентов в следующих способах диагностики: томографии с помощью рентгеновских лучей, томографии с помощью ядерного магнитного резонанса (M.R.I.) (ЯМР-томография) и сцинтиграфии.

В частности, в медицинской диагностике, использующей ЯМР-томографию (M.R.I.), признанную мощным способом диагностики в клинической практике (Stark, D.D., Bradley, W.G., Jr., Eds. "Magnetic Resonance Imaging" The C.V. Mosby Company, St. Louis, Missouri (USA), 1988), применяют, главным образом, парамагнитные фармацевтические композиции, предпочтительно содержащие хелатные комплексы ионов двух-трех-валентных парамагнитных металлов с полиаминополикарбоксильными лигандами и/или их производными или аналогами.

Изображения, полученные, по существу, за счет ЯМР-сигнала протонов воды, являются результатом сложных взаимосвязей между различными параметрами, такими как плотность протонов и время релаксации T_1 и T_2 . Усиления контраста можно достичь за счет введения экзогенных химических веществ, которые значительно изменяют резонансные характеристики соседних протонов воды (см. Lauffer, R.V. Chem. Rev. 1987, 87, 901).

Парамагнитные контрастные агенты, используемые для ЯМР-томографии, изменяют время релаксации протонов воды, присутствующей в тканях, в которых указанные контрастные агенты сконцентрированы, и поэтому они усиливают контраст между различными тканями или между здоровой и больной тканью.

Парамагнитные комплексы гадолиния были целью исследований, публикаций и патентов благодаря своей высокой способности уменьшать время релаксации протонов соседних молекул воды в результате диполярных взаимодействий.

Некоторые из них представлены в клинической практике в качестве M.R.I. контрастных агентов:

Gd-DTPA, гадолиниевого комплекса N-метилглюкаминовой соли диэтилентриаминопентауксусной кислоты, MAGNEVIST®; Gd-DOTA, гадолиниевого комплекса N-метилглюкаминовой соли 1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусной кислоты, DOTAREM®; Gd-HPDO3A, гадолиниевого комплекса [10-(2-гидрокси-пропил)-1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7-триуксусной кислоты, PROHANCE®; Gd-DTPA-BMA, гадолиниевого комплекса бис(метиламида) диэтилентриаминопентауксусной кислоты, OMNISCAN®.

Перечисленные выше контрастные агенты коммерчески доступны и предназначены для широкого использования. На деле, после введения для получения M.R.I. указанные контрастные агенты диффундируют в крови и во внеклеточных зонах различных частей тела, прежде чем они выводятся. Поэтому в этом плане они аналогичны иодированным соединениям, которые используют в медицине для диагностики с помощью рентгеновских лучей.

В настоящее время медицинские работники нуждаются в таких контрастных агентах, которые предназначены для исследования конкретных органов, или для томографии кровеносной системы, которую нельзя качественно определить с

помощью продуктов, коммерчески доступных в настоящее время. Первоначальный подход для получения последних состоит в ковалентном связывании контрастного агента с макромолекулами, такими как белки, или в заключении их внутрь стабильных агрегатов молекул, таких как липосомы, или в использовании так называемых суперпарамагнитных частиц.

Так, например, гадолиниевый комплекс диэтилентриаминопентауксусной кислоты (Gd-DTPA) связывали с человеческим альбумином (HSA), полилизинном или декстраном (Oksendal A.N. et al., *J. Magn. Reson. Imaging*, 157, 1993; Rocklage S.M., "Contrast Agents", *Magn. Res. Imaging, Mosby Year Book*, 372-437, 1992) для уменьшения или даже прекращения диффузии из крови во внеклеточную жидкость, обеспечивая тем самым более длительное пребывание агента в кровеносной системе. Такой подход хотя и позволял достичь нужного эффекта, страдает от nepозволительных побочных эффектов, так как сам агент выводится при этом с трудом.

Другой подход состоит в использовании суперпарамагнитных частиц, покрытых полиэтиленгликолями или углеводородами для уменьшения захвата их в печени эндотелиальным ретикуломом или в других системах (Tilcock C., *Biochim. Biophys. Acta*, 77, 1993; Bogdanou A.A. et al., *Radiology*, 701, 1993), тем самым увеличивая длительность пребывания этих агентов в крови. В этом случае также наблюдаются вышеуказанные эффекты, а также возникают проблемы, связанные с высокой стоимостью производства.

Поэтому до сих пор существует необходимость в эффективном агенте для кровяного депо, который обладал бы низкой токсичностью и отличался бы разумной ценой.

Некоторые комплексы, полученные в результате конъюгации желчной кислоты с хелатирующим агентом, которые способны образовывать хелатные комплексы с ионами парамагнитных двух-трехвалентных металлов, уже были ранее раскрыты заявителем в международной патентной заявке WO-A-95/32741.

Указанные соединения демонстрируют хорошую гепатобилиарную экскрецию (см. Anelli P.L. et al., *Acta Radiologica*, 38, 125, 1997), что делает их многообещающими контрастными агентами для визуализации гепатобилиарной системы.

Неожиданно было обнаружено, что специфический класс указанных соединений остается в сосудистой системе достаточно длительное время, что дает возможность использовать их в качестве контрастных агентов для томографии сосудистой системы, в частности коронарной системы.

Этот эффект можно четко наблюдать в тестах *in vivo* на животных (таких как кролики и обезьяны). Постоянство нахождения этих соединений в сосудистой системе действительно можно немедленно выявить при построении диаграммы значений времени релаксации протонов ($1/T_1$) в образцах крови животного, отобранных с соответствующими временными интервалами после введения контрастного агента.

Так как комплексы Gd(III) являются парамагнитными, высокие значения $1/T_1$ являются доказательством наличия в крови высоких концентраций контрастного агента.

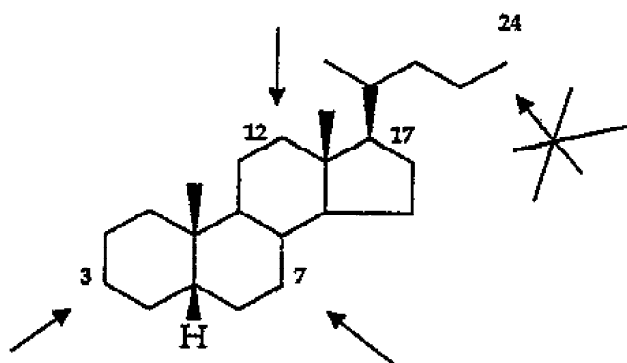
Различие между обычным внеклеточным контрастным агентом и агентом кровяного депо хорошо показано в статье Lauffer et al., *Radiology*, 529, 1998, где приводятся кривые для T_1 в крови как функция времени, прошедшего после введения контрастного агента.

В частности, комплексы, одной из стадий получения которых является способ в соответствии с настоящим изобретением, при введении, например, кроликам в дозе,

сравнимой с разумным коэффициентом безопасности, способны вызвать изменения в скоростях релаксации (определяемых как $\Delta 1/T_1$) в крови более чем 5 сек^{-1} через 10 мин после введения и таким образом являются многообещающими соединениями для использования в качестве контрастных агентов для томографии кровеносной системы.

Было обнаружено, что этот тип эффекта нельзя полностью отнести за счет присутствия желчных кислот, но он зависит от химического строения комплексов. По-видимому, в действительности хелатирующий фрагмент должен предпочтительно связываться со стероидальным скелетом связью в положениях 3, 7 или 12 желчной кислоты.

Действительно, было доказано, что любая связь между хелатирующим фрагментом и желчной кислотой, включающая карбоксильную группу в положении 24, приводит к образованию комплексов, отличающихся неудовлетворительным постоянством в сосудистой системе:



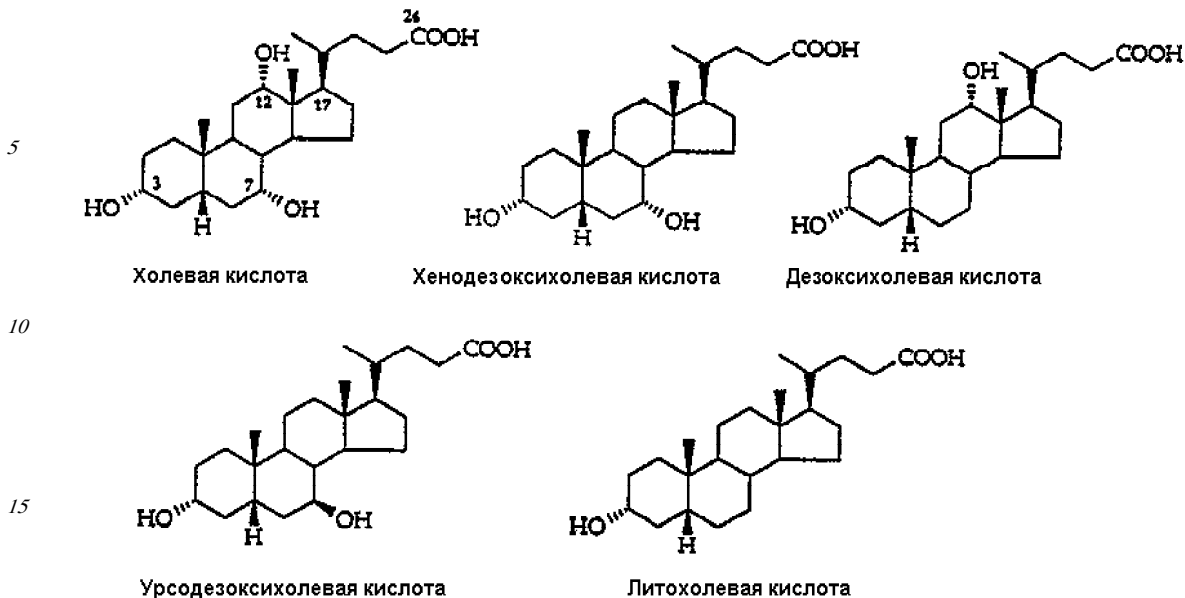
Поэтому способ настоящего изобретения является частью синтеза комплексов соединений общей формулы (I) с ионами парамагнитных двух-трехвалентных металлов, выбранных из группы, состоящей из $\text{Fe}^{(2+)}$, $\text{Fe}^{(3+)}$, $\text{Cu}^{(2+)}$, $\text{Cr}^{(3+)}$, $\text{Gd}^{(3+)}$, $\text{Eu}^{(3+)}$, $\text{Dy}^{(3+)}$, $\text{Yb}^{(3+)}$ или $\text{Mn}^{(2+)}$,

X-L-Y (I),

где X представляет остаток полиаминополикарбоксильного лиганда или его производного, выбранного из группы, состоящей из:

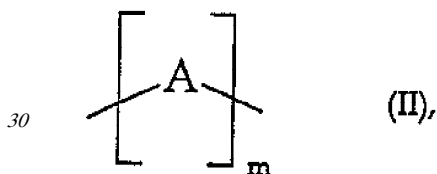
этилендиаминотетрауксусной кислоты (EDTA), диэтилентриаминопентауксусной кислоты (DTPA), 1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусной кислоты (DOTA), 1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7-триуксусной кислоты (DO3A), [10-(2-гидроксипропил)-1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7-триуксусной кислоты (HPDO3A), 4-карбокси-5,8,11-трис(карбоксиметил)-1-фенил-2-окса-5,8,11-триазатридекан-13-овой кислоты (БОРТА);

Y представляет производное желчной кислоты, выбранное из группы, состоящей из остатков хеновой, хенодесоксихолевой, десоксихолевой, урсодесоксихолевой, литохолевой кислот:



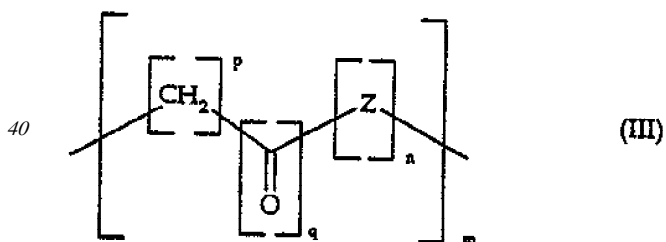
как таковых, а также как функционируемых по положениям, содержащим гидроксильную группу в качестве реакционно-способной группы, независимо от стереохимии конечных продуктов, причем указанное производное включает также конъюгат кислотной группы в положении 24 с таурином и глицином;

L представляет цепь, связанную с любым положением X, необязательно включающую одну из карбоксильных групп, которая таким образом превращается в амидную группу, и с C-3, C-7, C-12 положениями Y, и имеет следующую формулу (II):



где m представляет целое число от 1 до 10, где для значений больше 1, A может иметь различные значения;

35 A представлен следующей формулой (III):



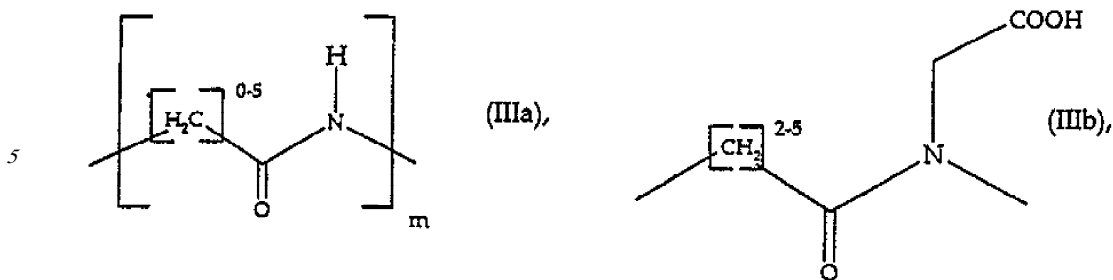
45 n и q могут быть 0 или 1, но они не могут одновременно быть нулем, r может принимать значения в интервале от 0 до 10,

Z представляет атом кислорода или -NR группу,

где R представляет атом водорода или (C₁-C₅)алкильную группу, незамещенную или замещенную -COOH группой,

50 используемых в качестве агентов для кровяного депо

Наиболее предпочтительными соединениями являются те, в которых пространственные цепи L имеют следующие общие формулы (IIIa) и (IIIb):



10 Предпочтительны также структуры, в которых Z представляет атом кислорода, а L при этом образуется за счет гидроксильных групп, присутствующих в 3, 7, 12 положениях, независимо от стереохимии конечных продуктов.

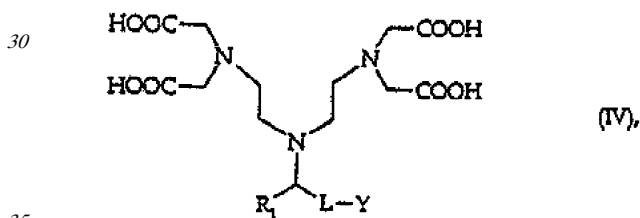
15 Особенно предпочтительны соединения формулы (I), в которых остаток X выбирают из группы, состоящей из: EDTA, ДТРА, ДОТА, ДОЗА, ВОРТА; L выбирают из группы, состоящей из (IIIa), (IIIb).

20 Y предпочтительно выбирают из группы, состоящей из остатков холевой, дезоксихолевой, хенодезоксихолевой, литохолевой кислот, связанных с L через аминогруппу в 3 положении, и кислотная группа в положении 24 присутствует как таковая или в виде ее тауринового или глицинового производного.

Y можно также функционировать различным образом, например, превращая одну или более гидроксильных групп в кетогруппы.

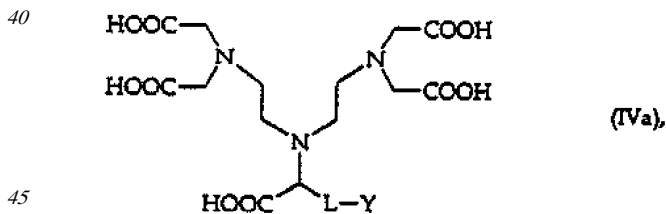
Особенно предпочтительными комплексами с ионами парамагнитных металлов, указанных выше, являются комплексы с гадолинием или с марганцем.

25 Предпочтительны соединения общей формулы (IV), в которых в общей формуле (I) остаток X представляет ДТРА, замещенный по центральной цепи, и где R₁ представляет атом водорода или -COOH группу,



где Y выбирают из группы, состоящей из остатков холевой, дезоксихолевой, хенодезоксихолевой, литохолевой кислот, а L представлено формулой (III).

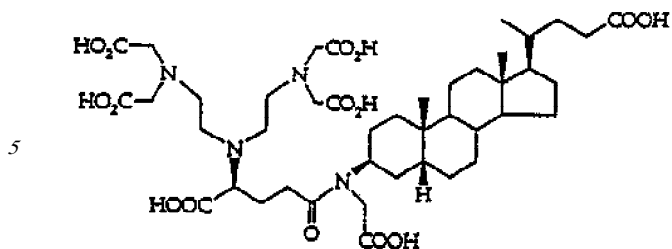
Особенно предпочтительны соединения общей формулы (IVa):



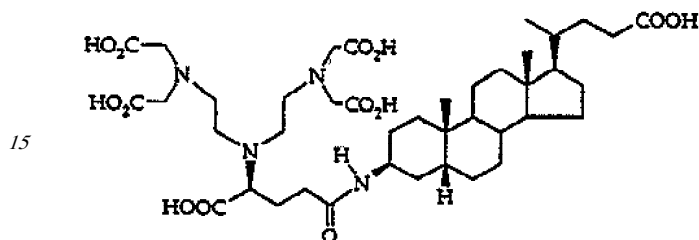
где R₁ представляет -COOH группу, а Y принимает указанные выше для соединений общей формулы (IV) значения, и L представлено формулами (IIIa) или (IIIb).

50 Следующими целями настоящего изобретения являются новые соединения, принадлежащие к классу соединений общей формулы (IVa), а также способы их получения:

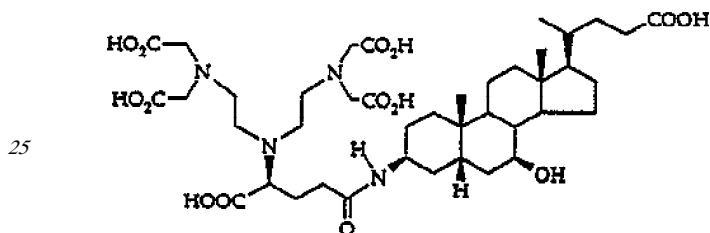
[3β(S),5β]-3-[[4-[бис[2-[бис(карбоксиметил)амино]этил]амино]-4-карбокси-1-оксобутил](карбоксиметил)амино]холан-24-овая кислота:



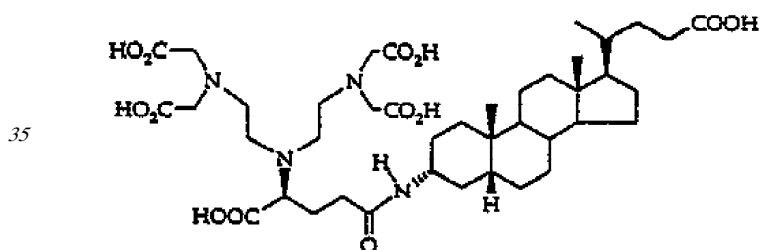
10 [3β(S),5β]-3-[[4-[бис[2-[бис(карбоксиметил)амино]этил]амино]-4-карбокси-1-оксобутил]амино]холан-24-овая кислота:



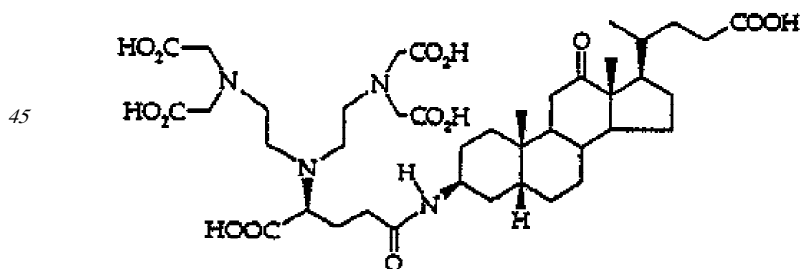
20 [3β(S),5β,7β]-3-[[4-[бис[2-[бис(карбоксиметил)амино]этил]амино]-4-карбокси-1-оксобутил]амино]-7-гидроксихолан-24-овая кислота:



30 [3α(S),5β]-3-[2-[[5-[бис[2-[бис(карбоксиметил)амино]этил]амино]-5-карбоксипентил]амино]-2-оксоэтокси]холан-24-овая кислота:

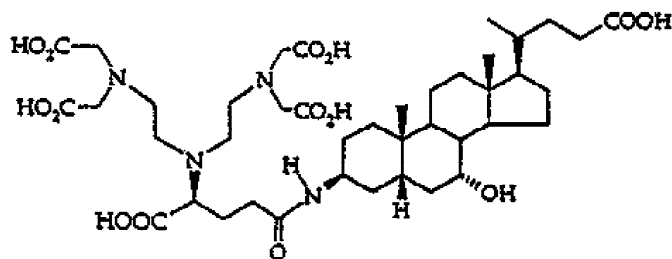


40 [3β(S),5β]-3-[[4-[бис[2-[бис(карбоксиметил)амино]этил]амино]-4-карбокси-1-оксобутил]амино]-12-оксохолан-24-овая кислота:



50 [3β(S),5β,7α]-3-[[4-[бис[2-[бис(карбоксиметил)амино]этил]амино]-4-карбокси-1-оксобутил]амино]-7-гидроксихолан-24-овая кислота:

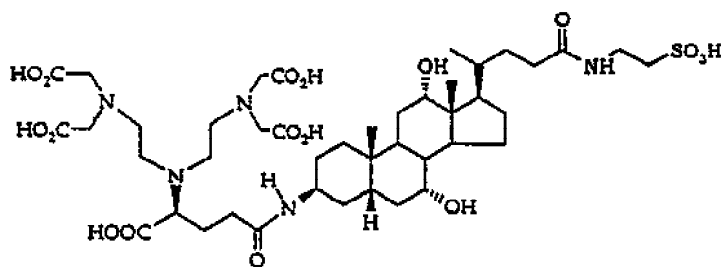
5



10

N^2 -бис[2-[бис(карбоксиметил)амино]этил]-N-[(3 β ,5 β ,7 α ,12 α)-7,12-дигидрокси-24-оксо-24-[(2-сульфоэтил)амино]холан-3-ил]-L-глутамин:

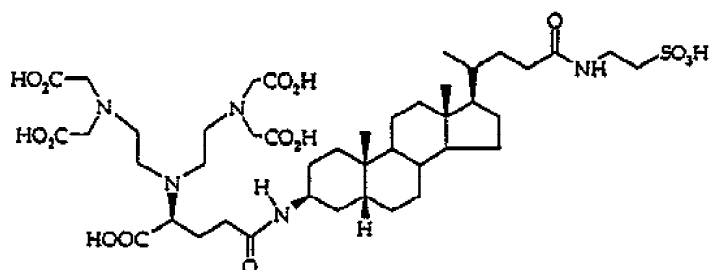
15



20

N^2 -бис[2-[бис(карбоксиметил)амино]этил]-N-[(3 β ,5 β)-24-оксо-24-[(2-сульфоэтил)амино]холан-3-ил]-L-глутамин:

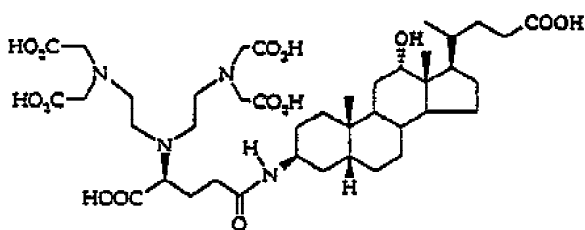
25



30

[3 β (S),5 β ,12 α]-3-[[4-[бис[2-[бис(карбоксиметил)амино]этил]амино]-4-карбокси-1-оксобутил]амино]-12-гидроксихолан-24-овая кислота:

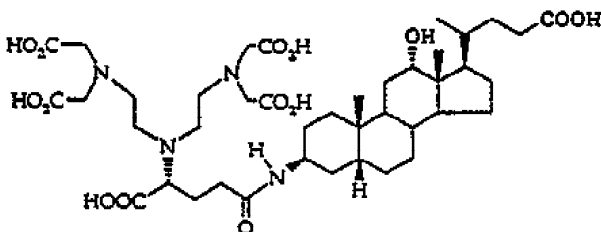
35



40

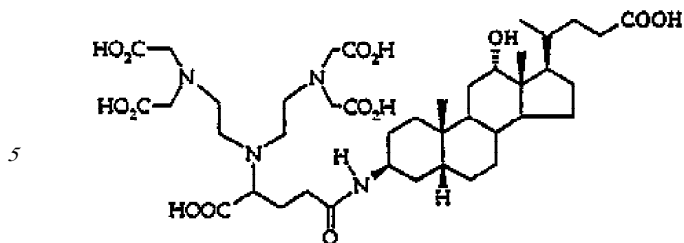
[3 β (R),5 β ,12 α]-3-[[4-[бис[2-[бис(карбоксиметил)амино]этил]амино]-4-карбокси-1-оксобутил]амино]-12-гидроксихолан-24-овая кислота:

45

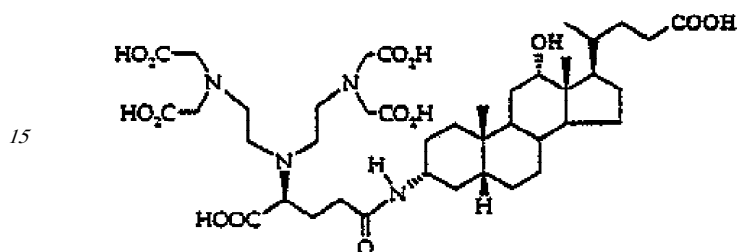


50

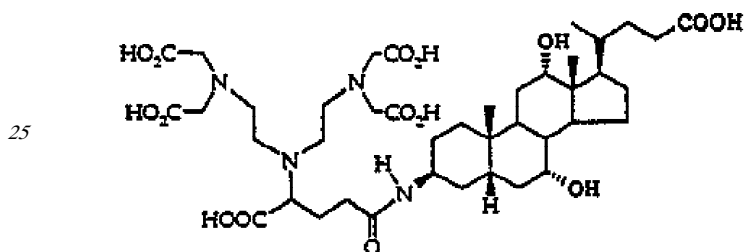
[3 β (RS),5 β ,12 α]-3-[[4-[бис[2-[бис(карбоксиметил)амино]этил]амино]-4-карбокси-1-оксобутил]амино]-12-гидроксихолан-24-овая кислота:



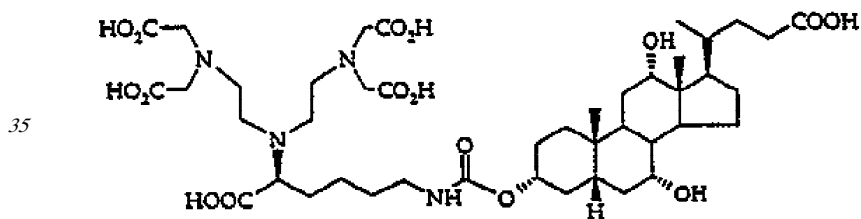
10 [3α(S),5β,12α]-3-[[4-[бис[2-[бис(карбоксиметил)амино]этил]амино]-4-карбокси-1-оксобутил]амино]-12-гидроксихолан-24-овая кислота:



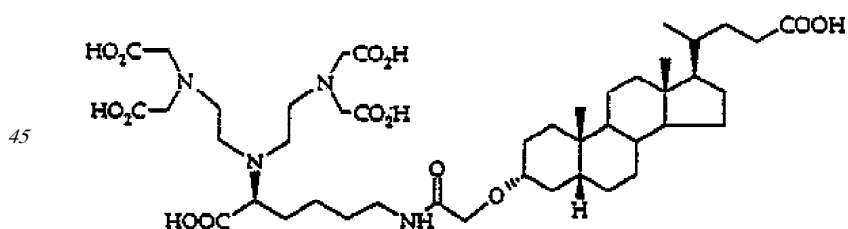
20 [3β(RS),5β,7α,12α]-3-[[4-[бис[2-[бис(карбоксиметил)амино]этил]амино]-4-карбокси-1-оксобутил]амино]-7,12-дигидроксихолан-24-овая кислота:



30 [3α(S),5β,7α,12α]-3-[[[5-[бис[2-[бис(карбоксиметил)амино]этил]амино]-5-карбоксипентил]амино]карбонил]окси]-7,12-дигидроксихолан-24-овая кислота:

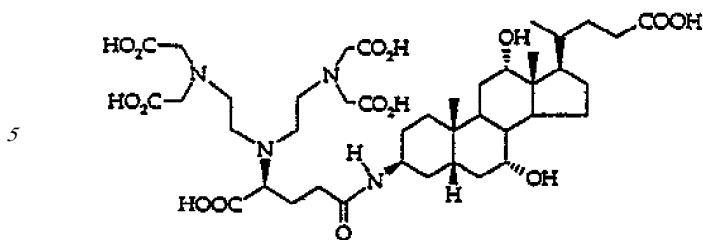


40 [3α(S),5β]-3-[2-[[5-[бис[2-[бис(карбоксиметил)амино]этил]амино]-5-карбоксипентил]амино]-2-оксоэтокси]холан-24-овая кислота:

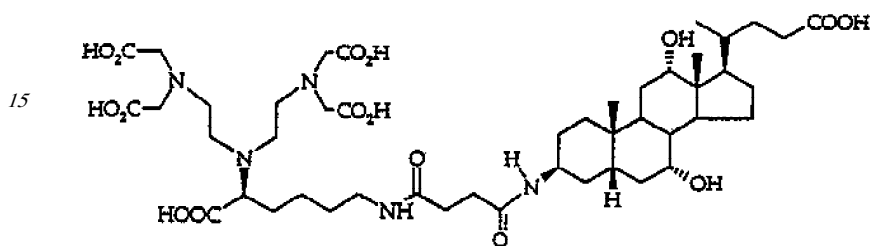


50 Другие соединения, принадлежащие к этому классу, комплексы которых с гадолинием раскрыты в патентной заявке WO-A-95/32741, представлены далее:

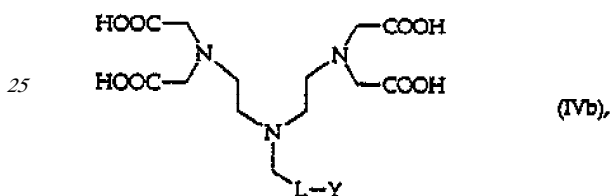
[3β(S),5β,7α,12α]-3-[[4-[бис[2-[бис(карбоксиметил)амино]этил]амино]-4-карбокси-1-оксобутил]амино]-7,12-дигидроксихолан-24-овая кислота:



10 [3 β (S),5 β ,7 α ,12 α)-3-[[4-[[5-[бис[2-[бис(карбоксиметил)амино]этил]амино]-5-карбоксипентил]амино]-1,4-диоксобутил]амино]-7,12-дигидроксихолан-24-овая кислота:



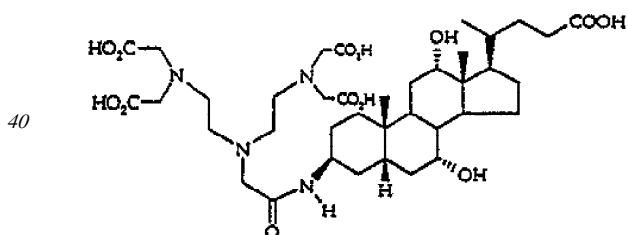
20 Предпочтительны также соединения общей формулы (IVb), которые также являются ДТРА производными, замещенными в центральном положении,



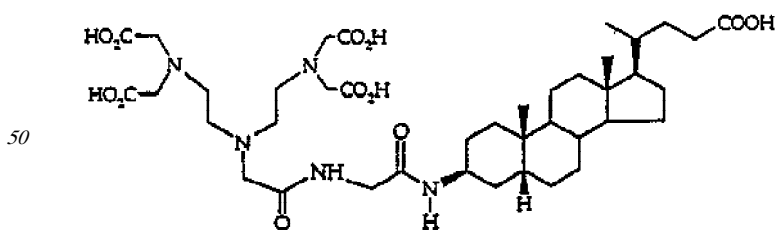
30 где Y принимает указанные выше для соединений формулы (IV) значения, а L принимает значения, соответствующие формуле (IIIa).

Далее настоящее изобретение относится к следующим новым соединениям, которые принадлежат к классу соединений общей формулы (IVb), а также к способу их

35 (3 β ,5 β ,7 α ,12 α)-3-[[[бис[2-[бис(карбоксиметил)амино]этил]амино]ацетил]амино]-7,12-дигидроксихолан-24-овая кислота:



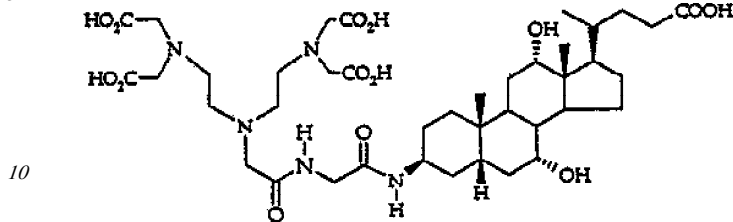
45 (3 β ,5 β)-3-[[[[[бис[2-[бис(карбоксиметил)амино]этил]амино]ацетил]амино]ацетил]амино] холан-24-овая кислота:



Другие соединения, принадлежащие к этому классу, комплексы которых с гадолинием были раскрыты в патентной заявке WO-A-95/32741, представлены далее:

(3 β ,5 β ,7 α ,12 α)-3-[[[[бис[2-[бис(карбоксиметил)амино]этил]амино]ацетил]амино]ацетил]амино]-7,12-дигидроксихолан-24-овая кислота:

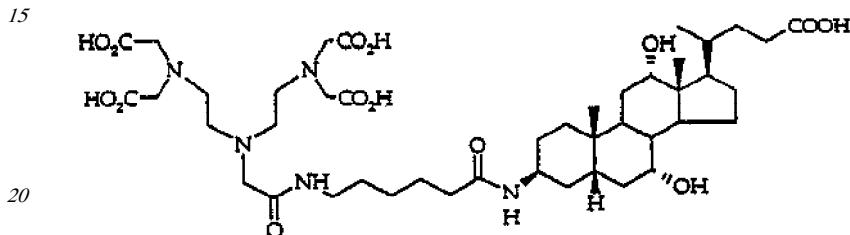
5



10

(3 β ,5 β ,7 α ,12 α)-3-[[6-[[[бис[2-[бис(карбоксиметил)амино]этил]амино]ацетил]амино]-1-оксогексил]амино]-7,12-дигидроксихолан-24-овая кислота:

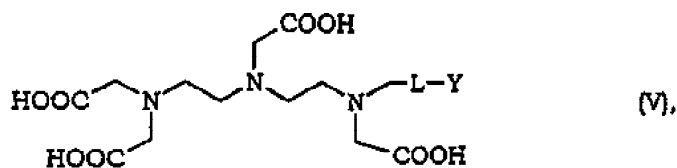
15



20

Особенно предпочтительны также соединения общей формулы (V), в которых в общей формуле (I) остаток X представляет ДТРА, Y принимает значения, указанные выше для соединений общей формулы (IV), и L представлен формулой (IIIа):

25

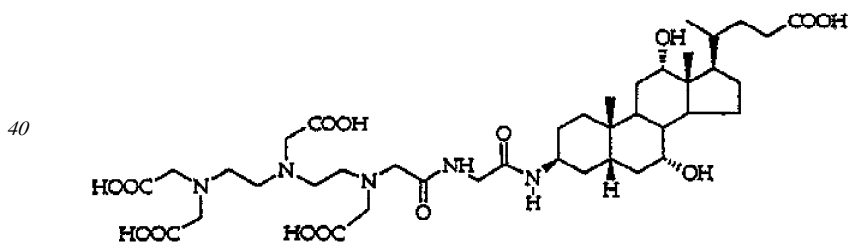


30

Другие соединения, принадлежащие этому классу, комплексы которых с гадолинием были раскрыты в патентной заявке WO-A-95/32741, представлены далее:

(3 β ,5 β ,7 α ,12 α)-3-[[N-[N-[2-[[2-[бис(карбоксиметил)амино]этил] (карбоксиметил)амино]этил]-N-(карбоксиметил)глицил]глицил]амино]-7,12-дигидроксихолан-24-овая кислота:

35

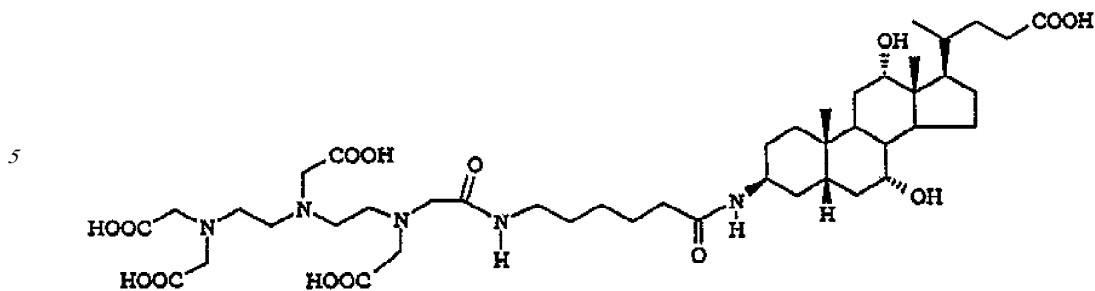


40

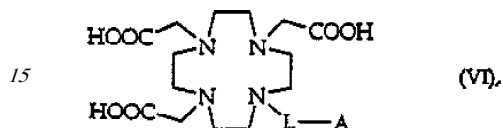
18-[(3 β ,5 β ,7 α ,12 α)-23-карбокси-7,12-гидрокси-24-норхолан-3-ил]амино]-3,6,9-трис(карбоксиметил)-11,18-диоксо-3,6,9,12-тетраазаоктадекановая кислота:

45

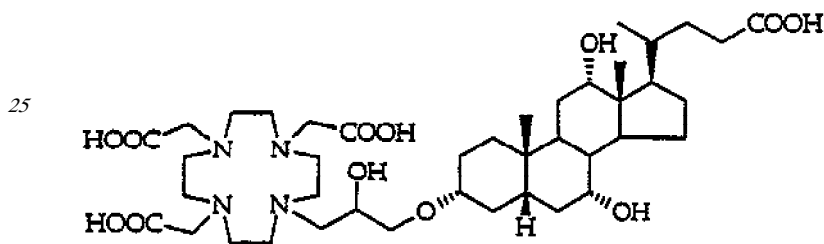
50



10 Предпочтительны также соединения формулы (VI), в которой в формуле (I) остаток X представлен DO3A, Y принимает значения, указанные выше для соединений общей формулы (IV), и L выбирают из соединений, соответствующих формулам (IIIa) и (IIIb):

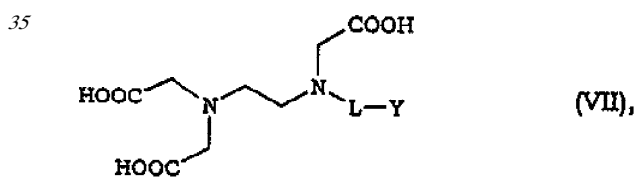


20 Среди соединений формулы (VI) особенно предпочтительна 10-[3-[[[(3 α ,5 β ,7 α ,12 β)-23-карбокси-7,12-дигидрокси-24-норхолан-3-ил]окси]-2-гидроксипропил]-1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7-триуксусная кислота, комплекс которой с гадолинием был раскрыт в патентной заявке WO-A-95/32741:

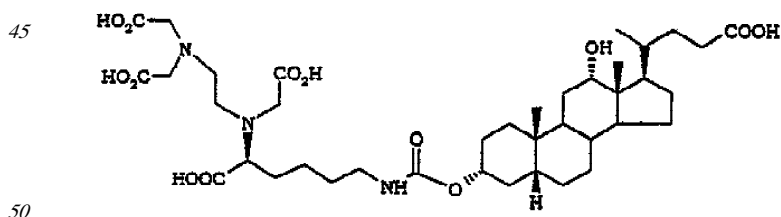


30 Аналогично предпочтительны соединения общей формулы (VII), в которых в формуле (I) остаток X представлен EDTA, Y принимает значения, указанные выше для соединений формулы (IV), а L соответствует формуле (III).

Особенно предпочтительны комплексы соединений формулы (VII) с марганцем:

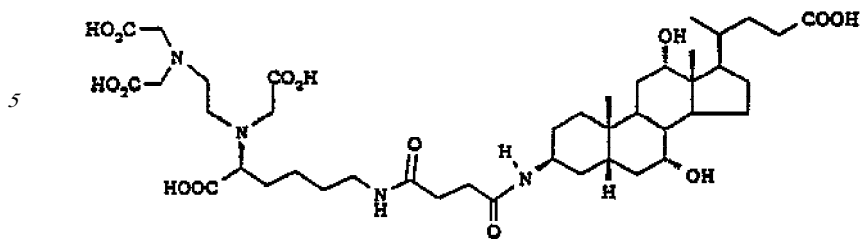


40 Среди соединений формулы (VII) особенно предпочтительны следующие:
[3 α (S),5 β ,12 α]-3-[[[5-[[2-[бис(карбоксиметил)амино]этил](карбоксиметил)амино]-5-карбоксипентил]амино]карбонил]окси]-12-гидроксихолан-24-овая кислота:

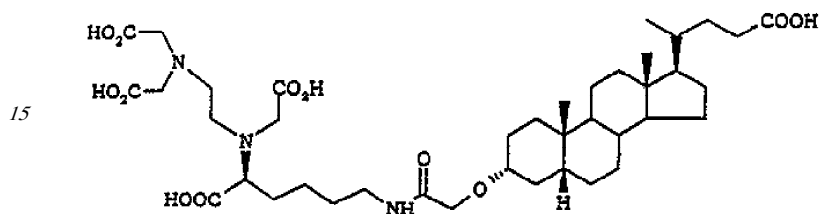


[3 β (S),5 β ,7 α ,12 α]-3-[[4-[[5-[[2-[бис(карбоксиметил)амино]этил](карбоксиметил)амино]-5-карбоксипентил]амино]-1,4-диоксобутил]амино]-7,12-

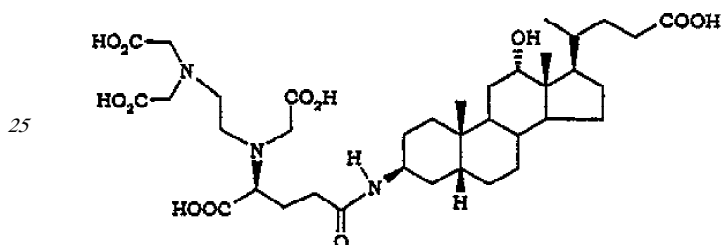
дигидроксихолан-24-овая кислота:



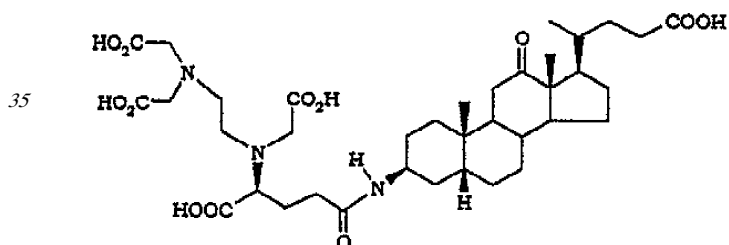
10 [3α(S),5β]-3-[2-[[5-[[2-[[бис(карбоксиметил)амино]этил](карбоксиметил)амино]-5-карбоксипентил]амино]-2-оксоэтокси]холан-24-овая кислота



20 [3β(S),5β,12α]-3-[[4-[[2-[[бис(карбоксиметил)амино]этил](карбоксиметил)амино]-4-карбокси-1-оксобутил]амино]-12-гидроксихолан-24-овая кислота:



30 [3β(S),5β]-3-[[4-[[2-[[бис(карбоксиметил)амино]этил](карбоксиметил)амино]-4-карбокси-1-оксобутил]амино]-12-оксохолан-24-овая кислота:



40 Соединения общей формулы (I) можно получить способом конвергентного синтеза, который включает:

- 45
- 1) синтез функционализованного лиганда, т.е. лиганда, способного координировать один ион парамагнитного металла, при этом оставаясь стабильно связанным с желчной кислотой за счет подходящей функциональной группы;
 - 2) синтез функционализованной желчной кислоты;
 - 3) реакцию сочетания двух различных синтонов;
 - 4) удаление любой защитной группы;
 - 5) образование комплекса с ионом парамагнитного металла;
- 50
- подробно проиллюстрирован в вышеуказанной патентной заявке WO-A-95/32741. Некоторые из предпочтительных способов получения лигандов настоящего изобретения включают образование амидной связи между двумя синтонами, причем

один из них является предшественником хелатообразующей системы парамагнитного иона (Синтон А), а другой является предшественником остатка желчной кислоты, содержащейся в конечном комплексе (Синтон В).

5 Описываемые далее способы не следует рассматривать как ограничивающие способы получения соединений настоящего изобретения.

Амидную связь можно создать:

а) осуществляя взаимодействие синтонов А, содержащих карбоксильную функцию, с синтоном В, содержащим первичную или вторичную аминофункцию;

10 б) осуществляя взаимодействие синтонов А, содержащих первичную или вторичную аминофункцию, с синтоном В, содержащим карбоксильную функцию;

с) осуществляя взаимодействие ДТРА диангирида (коммерчески доступный продукт) с синтоном В, содержащим первичную или вторичную аминофункцию.

15 Перечень некоторых синтонов А и В, используемых в способе настоящего изобретения, представлен в следующей таблице:

20

25

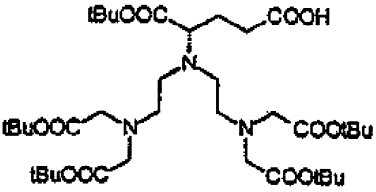
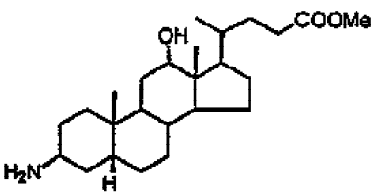
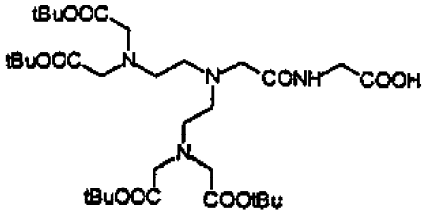
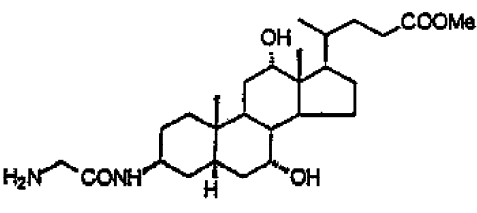
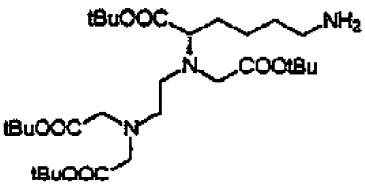
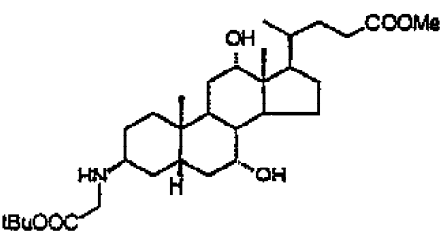
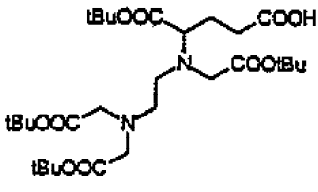
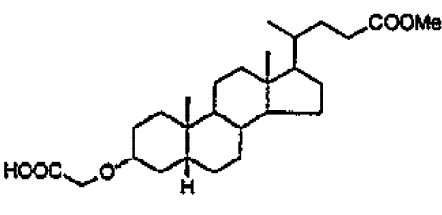
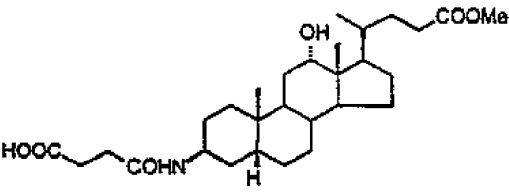
30

35

40

45

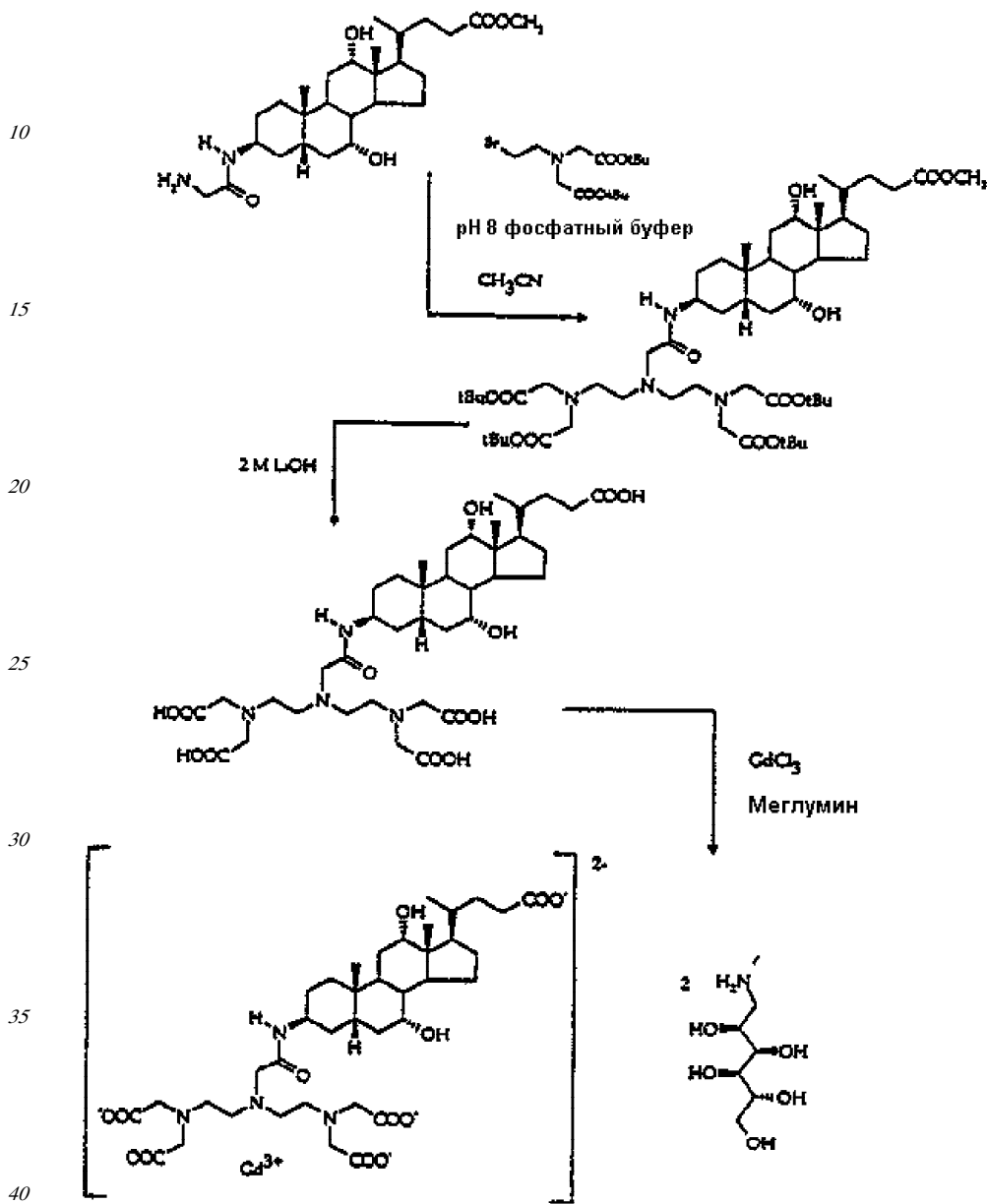
50

	СИНТОН А	СИНТОН В
5		
10		
15		
20		
25		
30		
35		
40		
45		

Естественно, что используемые синтоны должны быть хорошо защищены по тем группам, которые могли бы стать источником нежелательных реакций в условиях, которые используют для создания амидной связи. После образования амидной связи между двумя синтонами можно предусмотреть одну или более из стадий удаления защитных групп для сохранения групп исходных.

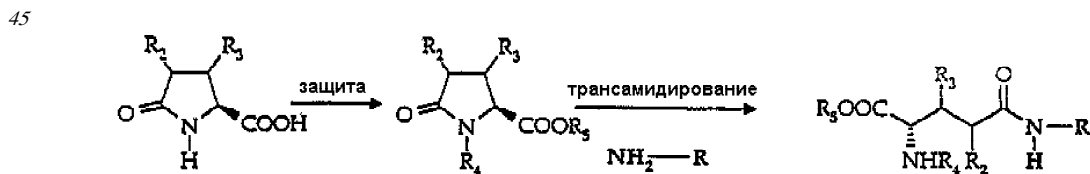
В качестве альтернативы способам такого типа хелатирующую субъединицу можно ввести в результате многостадийных реакций, исходя из производного желчной кислоты, как в случае синтеза соединений, раскрытых в примере 3 экспериментального раздела, что иллюстрируется на схеме 1:

5
Схема 1



Настоящее изобретение относится также к новому способу, проиллюстрированному на следующей схеме 2:

Схема 2



где R₄ представляет аминокзащитную группу;
R₅ представляет разветвленный или неразветвленный C₁-C₁₀алкил или арил;
R₂ и R₃ представляют независимо атом водорода, разветвленный или

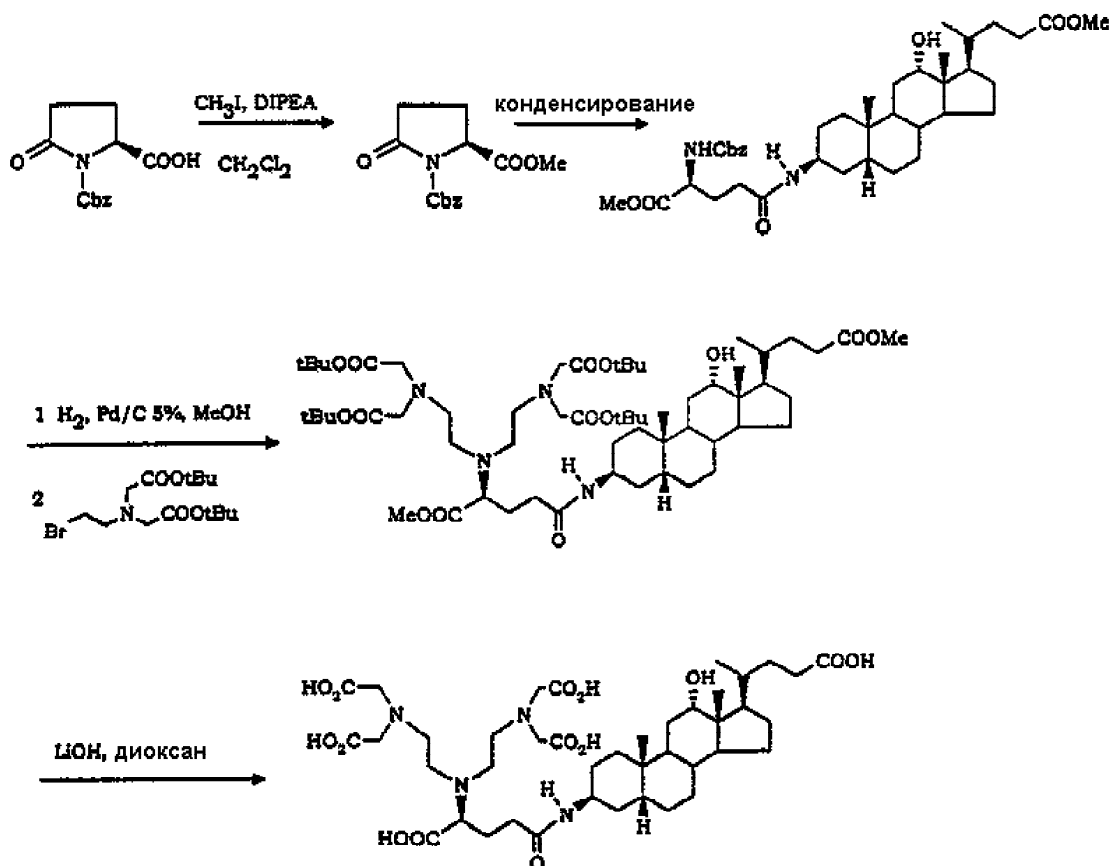
неразветвленный C₁-C₂₀ алкил, незамещенный или замещенный арильными группами, или указанные группы образуют C₃-C₁₀ цикл;

причем в этом способе используется реакция трансамидирования, что позволяет сохранить стереохимию по хиральному центру, соседнему с атомом азота исходного пирролидинона, и получить вторичный амид. Объединенный выбор групп R₄ и R₅ важен в том плане, что расщепление должно происходить в различных условиях. Возможными примерами R₄ являются карбоксибензилокси (Cbz) группы, а примерами R₅ являются метильная или трет-бутильная группы.

Данный способ обычно используют для получения γ-амидов глутаминовой кислоты и он очень полезен и выгоден для получения соединений настоящего изобретения, в частности γ-амидов глутаминовой кислоты с 3-аминопроизводными остатков Y, как определено выше. В действительности он позволяет получить конечное соединение, избегая использования дорогостоящих конденсирующих агентов для образования γ-амидо связи между глутаминовой кислотой и соответствующим амином.

Примером применения этого совершенно нового способа является синтез [3β(S),5β,12α]-3-[[4-[бис[2-[бис(карбоксиметил)амино]этил]амино]-4-карбокси-1-оксобутил]амино]-12-гидроксихолан-24-овой кислоты, обычный способ получения которой представлен в примере 4 экспериментального раздела, тогда как альтернативный способ представлен в примере 5, и полная схема синтеза представлена далее на схеме 3:

Схема 3



Аналогично получают производное холевой кислоты, уже описанное в патентной заявке WO-95/32741, [3β(S),5β,7α,12α]-3-[[4-[бис[2-[бис(карбоксиметил)амино]этил]амино]-4-карбокси-1-оксобутил]амино]-7,12-дигидроксихолан-24-овую кислоту.

Ионами металлов, способными образовывать комплекс с хелатирующими агентами

общей формулы (I), являются двухвалентные или трехвалентные ионы элементов, выбранные из группы, состоящей из $\text{Fe}^{(2+)}$, $\text{Fe}^{(3+)}$, $\text{Cu}^{(2+)}$, $\text{Cr}^{(3+)}$, $\text{Gd}^{(3+)}$, $\text{Eu}^{(3+)}$, $\text{Dy}^{(3+)}$, $\text{Yb}^{(3+)}$ или $\text{Mn}^{(2+)}$.

5 Что касается диагностического использования новых хелатных комплексов настоящего изобретения, то их можно использовать в качестве контрастных агентов, особенно для применения в качестве агентов для кровяного депо для диагностики с помощью ЯМР-томографии.

10 Комплексы получают обычно в соответствии со способом, в котором оксид или подходящую соль парамагнитного металла, растворенную в воде или суспендированную в водно-спиртовом растворе, добавляют к водному или водно-спиртовому раствору хелатирующего агента при перемешивании, и, при необходимости, нагревают умеренно или до температуры кипения, до завершения реакции. Если комплекс нерастворим в реакционном растворителе, его можно
15 отфильтровать. Если он растворим, его можно выделить, выпаривая растворитель до получения остатка, например, с помощью сушки распылением.

В том случае, если полученный комплекс все еще содержит свободные кислотные группы, его превращают в нейтральную соль реакцией с органическим или
20 неорганическим основанием, которые образуют физиологически совместимые катионы в растворах.

Для получения таких нейтральных солей достаточное количество основания можно добавить к комплексам, содержащим свободные кислотные группы, в водном
25 растворе или суспензии до нейтральности. Полученный раствор можно обычным образом выпарить или подходящий растворитель можно добавить для кристаллизации соли комплекса.

Предпочтительные неорганические катионы, пригодные для получения солей хелатных комплексов настоящего изобретения, включают, в частности, ионы
30 щелочных или щелочно-земельных металлов, таких как калий, натрий, кальций, магний и их смеси. Особенно предпочтителен ион натрия.

Предпочтительные катионы, полученные из органических оснований, пригодные для вышеуказанных целей, включают (наряду с другими) катионы первичных,
35 вторичных и третичных аминов, таких как этаноламин, диэтанолламин, морфолин, глюкамин, N-метилглюкамин, N,N-диметилглюкамин, причем наиболее предпочтителен N-метилглюкамин.

Предпочтительные катионы, полученные из аминокислот, включают, например, катионы таурина, глицина, лизина, аргинина или орнитина.

40 Альтернатива этому способу состоит в получении композиций для инъекций без выделения соли комплекса. В этом случае конечный раствор обязательно не должен содержать свободных ионов металла, которые токсичны для организма.

Это можно проверить титрованием, например, с цветными индикаторами, такими как ксиленол оранжевый. Можно также предусмотреть стадию очистки соли
45 комплекса.

В такого типа способе хелатирующий агент, соль или оксид металла и любые солеобразующие основания подвергают взаимодействию в стехиометрических
50 отношениях в воде для инъекций, затем после завершения реакции пиролены отфильтровывают и продукт распределяют в подходящие контейнеры, а затем осуществляют термическую стерилизацию.

Фармацевтические композиции для инъекций обычно получают, растворяя активный ингредиент, полученный как указано выше, и эксципиенты в воде

необходимой степени чистоты с фармакологической точки зрения с тем, чтобы получить фармацевтическую композицию, пригодную для энтерального или парентерального введения, в молярных концентрациях в интервале от 0,01 до 1,0. Полученный контрастный агент соответствующим образом стерилизуют.

5 Контрастные агенты вводят в зависимости от диагностических требований в дозах от 0,01 до 0,3 ммоль/кг массы тела.

В принципе дозы для парентерального введения находятся в интервале от 0,001 до около 1,0 ммоль/кг массы тела. Предпочтительные дозы для парентерального

10 введения находятся в интервале от 0,01 до около 0,5 ммоль/кг массы тела. Дозы для энтерального введения обычно находятся в интервале от 0,5 до около 10 ммоль/кг массы тела, предпочтительно от около 1,0 до около 10 ммоль/кг массы тела.

15 Новые композиции настоящего изобретения демонстрируют хорошую переносимость; более того, их растворимость в воде является дополнительной важной особенностью, которая делает их особенно подходящими для использования в ядерном магнитном резонансе.

20 Диагностические композиции настоящего изобретения используют обычным образом. Композиции можно вводить пациенту, обычно теплокровному животному, как системно, так и поверхностно в орган или ткань, которые предстоит визуализировать с использованием ядерного магнитного резонанса.

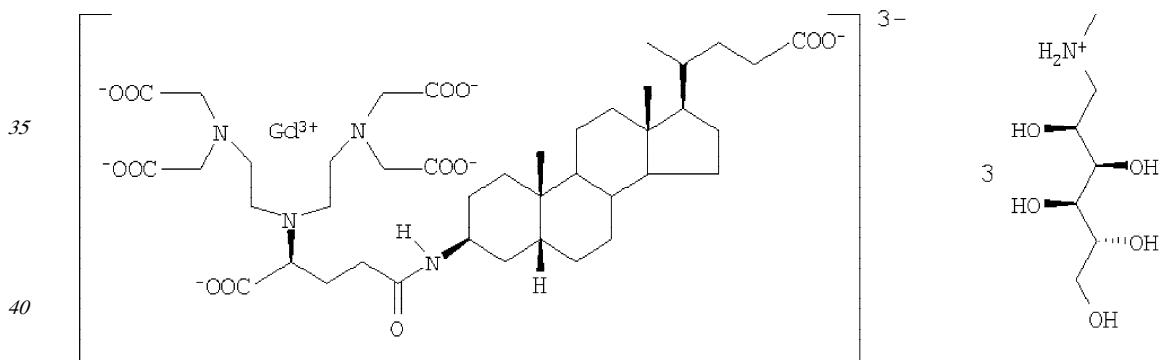
Схемы анализов и аппаратуру можно найти в работах, таких как Stark, D.D., Bradley, W.G., Magnetic Resonance Imaging, Mosby Year Book, St. Louis, Mo, 1992.

25 Используемые условия экспериментов будут проиллюстрированы подробно в экспериментальном разделе.

Экспериментальный раздел

ПРИМЕР 1

30 Комплекс гадолиния с 1-деокси-1-(метиламино)-D-глицитоловой солью [3β(S),5β]-3-[[4-[бис[2-[бис(карбоксиметил)амино]этил]амино]-4-карбокси-1-оксобутил]амино] холан-24-овой кислоты (1:3):



45 А) Метилловый эфир [3β(S),5β]-3-[[5-(1,1-диметилэтокси)-4-[бис[2-[бис[2-(1,1-диметилэтокси)-2-оксоэтил]амино]этил]амино]-1,5-диоксопентил]амино]холан-24-овой кислоты

50 3,6 г Метилового эфира (3β,5β)-3-аминохолан-24-овой кислоты (полученного аналогично способу, раскрытому в WO-A-95/32741: пример 5) (9,24 ммоль), 8,5 г трет-бутилового эфира N,N-бис[2-[бис[2-(1,1-диметилэтокси)-2-оксоэтил]амино]этил]-L-глутаминовой кислоты (полученного как описано в WO-A-95/32741: пример 15) (11,39 ммоль) и 1,64 г диэтилцианофосфоната (9,39 ммоль) растворяют в 160 мл ДМФ. Раствор охлаждают до 0°C, по каплям добавляют 1,28 мл Et₃N (9,24 ммоль) и реакционную смесь оставляют на 30 минут при комнатной температуре. Спустя 1 час

раствор упаривают при пониженном давлении, остаток смешивают с EtOAc, промывают 5% NaHCO₃, а затем рассолом. Органическую фазу выделяют, сушат над Na₂SO₄, а затем выпаривают при пониженном давлении. Сырой продукт очищают с помощью флэш-хроматографии, получая 9,5 г нужного продукта (8,50 ммоль).

Выход: 92%

К.Ф.: 3,47%

Элементный анализ	C	H	N
% вычислено:	66,63	9,74	5,01
% найдено: ^a	67,42	10,08	5,07

^a - после сушки при 120°C в вакууме

ТСХ: Неподвижная фаза: пластина силикагеля 60F 254 Merck

Элюент = 4:6 EtOAc/н-гексан

Детектирование: 0,5% KMnO₄ в 1 М NaOH R_f = 0,46

Спектры ¹H-ЯМР, ¹³C-ЯМР, ИК и МС соответствуют указанной структуре.

В) Метилловый эфир [3β(S),5β]-3-[[4-карбокси-4-[бис[2-[бис(карбоксиэтил)амино]этил]амино]-1-оксобутил]амино]холан-24-овой кислоты

К перемешиваемому раствору 9,3 г соединения, полученного на стадии А) (8,32 ммоль), в 50 мл CH₂Cl₂ добавляют 5,1 мл CF₃COOH (66,6 ммоль); спустя 10 минут при температуре 0-5°C раствор выпаривают. Остаток помещают в 50 мл CF₃COOH и спустя 24 часа при комнатной температуре добавляют еще 30 мл CF₃COOH для завершения реакции. Через 5 часов реакцию смесь выпаривают и остаток обрабатывают CH₂Cl₂, выпаривая каждый раз растворитель при пониженном давлении до получения порошка. Твердый продукт промывают H₂O, фильтруют и сушат, получая нужный продукт (6,9 г; 8,24 ммоль).

Выход 99% Т.пл.: 205°C

К.Ф.: 7,78%

Элементный анализ	C	H	N
% вычислено:	60,27	8,18	6,69
% найдено: ^a	59,28	8,11	6,68

^a - после сушки при 120°C в вакууме

ТСХ: Неподвижная фаза: пластина силикагеля 60F 254 Merck

Элюент = 6:4:1 CHCl₃/MeOH/25% NH₄OH.

Детектирование: 0,5% KMnO₄ в 1 М NaOH R_f = 0,28

Спектры ¹H-ЯМР, ¹³C-ЯМР, ИК и МС соответствуют указанной структуре.

С) [3β(S),5β]-3-[[4-[бис[2-[бис(карбоксиметил)амино]этил]амино]-4-карбокси-1-оксобутил]амино]холан-24-овая кислота

К суспензии 6,14 г соединения, полученного на стадии В) (7,33 ммоль), в 50 мл H₂O добавляют 50 мл 1 М NaOH (50 ммоль), поддерживая значение pH 13 с помощью pH-stat аппарата. Через 2 часа при комнатной температуре реакцию смесь подкисляют (pH 0,5) добавлением 12 М HCl, получая суспензию, которую фильтруют, промывают H₂O и сушат с получением нужного продукта (5,64 г; 6,85 ммоль).

Выход: 93% Т. пл.: 205°C

К.Ф.: 9,02%

Элементный анализ	C	H	N	Cl	Na
-------------------	---	---	---	----	----

% вычислено:	59,84	8,08	6,81	
% найдено: ^a	59,56	8,15	6,80	<0,1

^a - после сушки при 120°C в вакууме

5 ТСХ: Неподвижная фаза: пластина силикагеля 60F 254 Merck

Элюент = 6:4:1 CHCl₃/MeOH/25% NH₄OH

Детектирование: 0,5% KMnO₄ в 1 М NaOH R_f= 0,25

Спектры ¹H-ЯМР, ¹³C-ЯМР, ИК и МС соответствуют указанной структуре.

10 D) Комплекс гадолиния с 1-деокси-1-(метиламино)-D-глицитоловой солью [3β(S),5β]-3-[[4-[бис[2-[бис(карбоксиметил)амино]этил]амино]-4-карбокси-1-оксобутил]амино]холан-24-овой кислоты (1:3)

15 4,53 г соединения, полученного на стадии C) (5,5 ммоль), суспендируют в 50 мл H₂O и солюбилизируют 10 мл 2 М водного раствора меглумина (20 ммоль), получая раствор при pH 6,8. После этого в течение 1 часа добавляют 11 мл 0,5 М водного раствора GdCl₃ (5,5 ммоль), поддерживая значение pH 6,8 добавлением 6,5 мл 2 М водного раствора меглумина (13 ммоль). За ходом реакции следят с помощью капиллярного электрофореза. Через 2 часа раствор фильтруют через мембрану Millipore®, фильтруют через нанопористый фильтр и выпаривают. Остаток сушат, получая нужное соединение (6,15 г; 4,17 ммоль).

Выход: 76% Т пл.: 220°C

К.Ф.: 8,44%

25 СЕ (капиллярный электрофорез) анализ: 100% (площадь %)

Капилляр: кварцевое стекло 0,56 м × 50 мм с шариковой ячейкой

Напряжение: 25 кВ

Буфер: 0,05 М борат pH 9,3, 0,3 мМ EDTA

Температура: 40°C

30 Время остановки: 20 минут

Детектирование (УФ): 200-210 нм

Инжекция: гидростатическая (50 мбар, 5 сек)

Концентрация образца: 1 мг/мл;

Прибор: Hewlett Packard 3D HPCE

35 Подготовка:

	t (мин)	действие				
	2	промыть H ₂ O				
	2	промыть 0,1 М NaOH				
40	1	промыть H ₂ O				
	5	промыть буфером				
	9	начало анализа				
Элементный анализ	C	H	Gd	N	Cl	Na
% вычислено:	47,65	7,35	10,06	6,27		
45 % найдено: ^a	47,83	7,36	10,01	6,24	<0,1	

^a - после сушки при 120°C в вакууме

Спектры ИК и МС соответствуют указанной структуре.

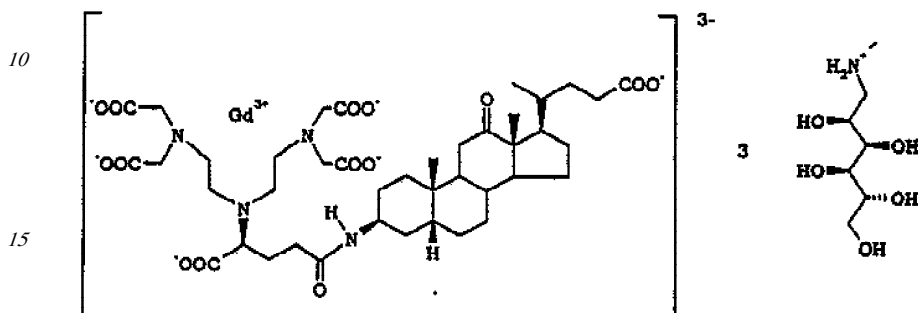
50 Нижеследующие соединения и соответствующие комплексы гадолиния получают аналогичным образом:

комплекс гадолиния с 1-деокси-1-(метиламино)-D-глицитоловой солью [3β(S),5β,7β]-3-[[4-[бис[2-[бис(карбоксиметил)амино]этил]амино]-4-карбокси-1-оксобутил]амино]-7-гидроксихолан-24-овой кислоты (1:3);

комплекс гадолиния с 1-деокси-1-(метиламино)-D-глицитоловой солью [3 α (S),5 β]-3-[2-[5-[бис[2-[бис(карбоксиметил)амино]этил]амино]-5-карбокспентил]амино]-2-оксоэтокси]холан-24-овой кислоты (1:3).

ПРИМЕР 2

Комплекс гадолиния с 1-деокси-1(метиламино)-D-глицитоловой солью [3 β (S),5 β]-3-[[4-[бис[2-[бис(карбоксиметил)амино]этил]амино]-4-карбокси-1-оксобутил]амино]-12-оксохолан-24-овой кислоты (1:3):



А) Метилловый эфир (3 β ,5 β)-3-азидо-12-оксохолан-24-овой кислоты 12,5 мл реагента Джонса [33,3 ммоль Cr(VI)] добавляют по каплям к раствору 17,8 г метилового сложного эфира (3 β ,5 β ,12 α)-3-азидо-12-гидроксихолан-24-овой кислоты (41,1 ммоль) (полученного аналогично способу, описанному для метилового эфира (3 β ,5 β ,7 α ,12 α)-3-азидо-7,12-дигидроксихолан-24-овой кислоты в WO-A-95/32741: пример 5) в ацетоне (600 мл) в течение 90 минут при комнатной температуре. Через 20 часов смесь фильтруют и раствор выпаривают. Остаток растворяют в CHCl₃ (400 мл) и раствор промывают насыщенным водным NaHCO₃, затем H₂O. Раствор сушат и выпаривают, получая сырой продукт, который кристаллизуют из 96% EtOH с получением 14,1 г нужного продукта (32,9 ммоль).

Выход: 84% Т.пл.:153°C

К.Ф.: <0,1%

[α]²⁰_D = + 83,25 (с 2,1, CHCl₃)

Элементный анализ	C	H	N
% вычислено:	69,90	9,15	9,78
% найдено:	69,98	9,32	9,69

ТСХ: Неподвижная фаза: пластина силикагеля 60F 254 Merck

Элюент: 8:2 н-гексан/EtOAc

Детектирование: 0,5% KMnO₄ в 1 М NaOH R_f=0,43

Спектры ¹H-ЯМР, ¹³C-ЯМР, ИК и МС соответствуют указанной структуре.

В) Метилловый эфир (3 β ,5 β)-3-амино-12-оксохолан-24-овой кислоты

Раствор 16,4 г соединения А) (38,2 ммоль) в ТГФ (130 мл) гидрируют в присутствии 5% Pd/C (1,6 г) при комнатной температуре и давлении 40 бар в течение 15 час в автоклаве Парра®. Реакционную смесь фильтруют (бумага и мембрана FH 0,5 мкм Millipore®) и упаривают. Сырой остаток очищают с помощью флэш-хроматографии, получая 11,8 г нужного продукта (29,2 ммоль).

Выход: 77% Т.пл.:129-130°C

К.Ф.: 1,04%

[α]²⁰_D=+87,8 (с 2,02, CHCl₃)

Элементный анализ	C	H	N
-------------------	---	---	---

% вычислено:	74,40	10,24	3,47
% найдено:	72,72	10,00	3,35

ТСХ: Неподвижная фаза: пластина силикагеля 60F 254 Merck

Элюент: 95:5 MeOH/Et₃N

Детектирование: 0,5% KMnO₄ в 1 М NaOH R_f=0,31

Спектры ¹H-ЯМР, ¹³C-ЯМР, ИК и МС соответствуют указанной структуре.

С) Метилловый эфир [3β(S),5β]-3-[[4-[бис[2-[бис[2-(1,1-диметилэтокси)-2-оксоэтил]амино]этил]амино]-5-(1,1-диметилэтокси)-1,5-диоксопентил]амино]-12-оксохолан-24-овой кислоты

Раствор DCC (6,24 г, 30,3 ммоль) в CH₂Cl₂ (25 мл) добавляют по каплям в течение 30 минут к раствору 1-(1,1-диметилэтилового) эфира N,N-бис[2-[бис[2-(1,1-диметилэтокси)-2-оксоэтил]амино]этил]-L-глутаминовой кислоты (полученного как описано в WO-A-95/32741: пример 15) (21,5 г; 28,9 ммоль), соединения В) (11,1 г, 27,5 ммоль) и НОВТ (1-гидроксибензотриазол) (3,72 г; 27,5 ммоль) в CH₂Cl₂ (300 мл) при 0°C в атмосфере азота. Смесь оставляют нагреваться до комнатной температуры. Через 21 час реакционную смесь фильтруют и раствор промывают насыщенным водным раствором NaHCO₃, затем H₂O и затем выпаривают. Сырой продукт очищают с помощью флэш-хроматографии, получая 24,5 г нужного продукта (21,7 ммоль).

Выход: 79%

[α]²⁰_D = +12,17 (с 2,07, CHCl₃)

ТСХ: Неподвижная фаза: пластина силикагеля 60F 254 Merck

Элюент: 1:1 EtOAc/н-гексан

Детектирование: 0,5% KMnO₄ в 1 М NaOH R_f= 0,45

Спектры ¹H-ЯМР, ¹³C-ЯМР, ИК и МС соответствуют указанной структуре.

Д) [3β(S),5β]-3-[[4-[бис[2-[бис(карбоксиметил)амино]этил]амино]-4-карбокси-1-оксобутил]амино]-12-оксохолан-24-овая кислота

80 мл ТФУ (трифторуксусная кислота) (1,0 моль) добавляют по каплям к раствору 23,8 г соединения, полученного на стадии С) (21,0 ммоль), в CH₂Cl₂ (50 мл) при 0°C в течение 1 часа. Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре, затем через 2 часа выпаривают. Остаток помещают в ТФУ (100 мл; 1,3 моль) и раствор перемешивают еще 24 часа. Затем реакционную смесь выпаривают, добавляют CH₂Cl₂ и снова выпаривают. Сырой остаток растворяют в 150 мл 1 М NaOH, охлаждая на бане со льдом, и раствор затем перемешивают в течение 15 часов (рН 10) при комнатной температуре. Доводят рН реакционной смеси до 13 добавлением 3,30 мл 30% NaOH и через 4 часа фильтруют через мембрану Millipore® (HAS 0,45 мкм). Фильтрат подкисляют 12,5 мл 30% HCl и 19 мл 1 М HCl до рН 1,60. Осадок отфильтровывают, промывают H₂O и сушат, получая 15,8 г нужного продукта (18,9 ммоль).

Выход 90% Т.пл. 172-175°C

К.Ф.: 1,98%

[α]²⁰_D = +43,54 (с 2,02, 1 М NaOH)

ВЭЖХ: 97% (площадь, %)

Неподвижная фаза: Zorbax ECLIPSE XDB-C8 3,5 мкм; 150 × 4,6 мм

Температура: 40°C

Подвижная фаза: градиентное элюирование

A = 0,017 М H₃PO₄, 0,3 мМ EDTA в H₂O

B = CH₃CN

Градиент:

	мин	%A	%B
	0	85	15
5	40	65	35
	50	65	35

Скорость потока: 1,5 мл/мин

Детектирование (УФ): 210 нм

	Элементный анализ	C	H	N	Cl	Na
10	% вычислено:	58,84	7,71	6,69		
	% найдено:	56,57	7,68	6,37	0,25	0,18

ТСХ: Неподвижная фаза: пластина силикагеля 60F 254 Merck

Элюент: 5:4:2 CHCl₃/MeOH/25% NH₄OHДетектирование: 0,5% KMnO₄ в 1 М NaOH R_f= 0,28Спектры ¹H-ЯМР, ¹³C-ЯМР, ИК и МС соответствуют указанной структуре.

Е) Комплекс гадолиния с 1-деокси-1-(метиламино)-D-глицитоловой солью [3β(S),5β]-
 20 3-[[4-[бис[2-[бис(карбоксиметил)амино]этил]амино]-4-карбокси-1-оксобутил]амино]-
 12-оксохолан-24-овой кислоты (1:3)

49,0 мл 0,918 М водного раствора меглумина (45,0 ммоль) добавляют по каплям к
 суспензии 14,0 г соединения, полученного на стадии D) (16,7 ммоль), в H₂O (100 мл)
 при комнатной температуре, получая прозрачный раствор (рН 6,5). К нему добавляют
 по каплям 31,6 мл 0,503 М водного раствора GdCl₃ (15,9 ммоль), поддерживая рН 6,5
 добавлением 55,7 мл 0,918 М водного раствора меглумина (51,1 ммоль) с помощью
 рН-stat. В конце добавления смесь фильтруют через мембрану Millipore® (HAWP 0,45
 мкм), пропускают через наночелювитель, рН доводят до 7,0 добавлением 0,100 мл 0,918 М
 водного раствора меглумина (0,092 ммоль) и выпаривают. Остаток сушат,
 получая 22,0 г нужного продукта (14,0 ммоль).

Выход 84% Т. пл. 100-105°C

К.Ф.: 5,06 %

ВЭЖХ анализ: 97% (площадь, %)

Неподвижная фаза: HYPURITY™ Elite C18 5 мкм; 250 × 4,6 мм колонка Hypersil

Температура: 40°C

Подвижная фаза: градиентное элюирование

A = 0,01 М KH₂PO₄ в водеB = CH₃CN

Градиент:

	мин	%A	%B
	0	95	5
45	40	65	35
	50	65	35

Скорость потока: 1 мл/мин

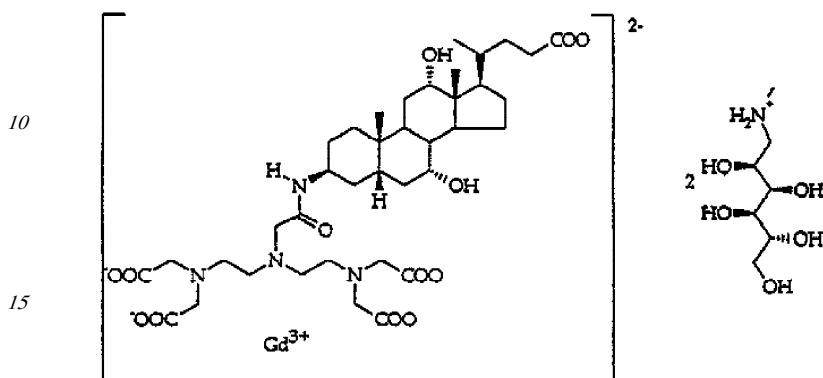
Детектирование (УФ): 210 нм

	Элементный анализ	C	H	N	Gd	Na	Cl
50	% вычислено:	47,23	7,16	6,22	9,97		
	% найдено:	45,70	7,32	6,00	9,41	< 0,1	

Спектры ИК и МС соответствуют указанной структуре.

ПРИМЕР 3

Комплекс гадолиния с 1-деокси-1-(метиламино)-D-глицитоловой солью
 [3β,5β,7α,12α]-3-[[[бис[2-[бис(карбоксиметил)амино]этил]амино]ацетил]амино]-7,12-
 5 дигидроксихолан-24-овой кислоты (1:2):



А) Метилловый эфир [3β,5β,7α,12α]-3-[[[бис[2-[бис[2-(1,1-диметилэтокс)-2-оксоэтил]
 20 амино]этил]амино]ацетил]амино]-7,12-дигидроксихолан-24-овой кислоты

24,8 г Метилового эфира (3β,5β,7α,12α)-3-[(аминоацетил)амино]-7,12-
 дигидроксихолан-24-овой кислоты (полученного по способу, раскрытому в WO-A-
 95/32741: пример 5) (51,9 ммоль) суспендируют в перемешиваемом растворе 38,7 г 1,1-
 диметилэтилового эфира N-(2-бромэтил)-N-[2-(1,1-диметилэтокс)-2-оксоэтил]
 25 глицина (полученного по способу, раскрытому в WO-A-95/32741: пример 15) (110
 ммоль) в 390 мл CH₃CN. Добавление 245 мл 2М фосфатного буфера рН 8 приводит к
 получению двухфазного раствора, который интенсивно перемешивают при
 комнатной температуре в течение 144 часов. Органическую фазу выделяют и
 30 выпаривают, оставшееся масло растворяют в 250 мл CH₂Cl₂. Раствор промывают H₂O,
 сушат (Na₂SO₄) и выпаривают. Сырой продукт очищают с помощью флэш-
 хроматографии (элюент = 95:5 CHCl₃/CH₃OH), получая нужный продукт (24,8 г; 24,3
 ммоль).

Выход: 47%

[α]²⁰_D = +9,45 (с 1,5, CHCl₃)

Элементный анализ	C	H	N
% вычислено:	64,68	9,47	5,49
% найдено:	64,55	9,44	5,46

ТСХ: Неподвижная фаза: пластина силикагеля 60F 254 Merck

Элюент: 88:12 CHCl₃/MeOH

Детектирование: 0,5% KMnO₄ в 1 М NaOH R_f = 0,57

Спектры ¹H-ЯМР, ¹³C-ЯМР, ИК и МС соответствуют указанной структуре.

В) (3β,5β,7α,12α)-3-[[[бис[2-[бис(карбоксиметил)амино]этил]амино]ацетил]амино]-
 7,12-дигидроксихолан-24-овая кислота

318 мл 2 М Водного раствора LiOH (636 ммоль) добавляют по каплям за 15 минут к
 раствору соединения, полученного на стадии А) (21,6 г, 21,1 ммоль), в 310 мл EtOH.

Через 23 часа EtOH выпаривают и реакционную смесь перемешивают еще 2 часа.

Раствор по каплям добавляют в 255 мл 2,6 М HCl и доводят рН до 1,4 30% NaOH.

Через 1,5 часа осадок отфильтровывают, промывают 300 мл 0,1 М HCl и сушат,
 получая нужный продукт (13,1 г; 16,7 ммоль).

Выход: 78% Т.пл.: 129-132°C (с разл.)

ВЭЖХ анализ: 97,8 % (площадь, %)

Неподвижная фаза: Lichrosorb RP-Select B 5 мкм; 250 × 4 мм колонка Merck KGaA

Температура: 45°C

Подвижная фаза: градиентное элюирование

A = 0,01 М KH_2PO_4 и 0,017 М H_3PO_4 в H_2O

B = CH_3CN

Градиент:

мин	%A	%B
0	95	5
5	20	80
45	20	80

Скорость потока: 1 мл/мин

Детектирование (УФ): 210 нм

Комплексометрический титр: 95,5% (0,1 М GdCl_3)

$[\alpha]_D^{20} = +13,03$ (с 5, 1 М NaOH)

Элементный анализ	C	H	N	Cl
% вычислено:	58,30	7,98	7,16	
% найдено:	54,63	8,12	6,64	1,82 H_2O 4,89

С) Комплекс гадолиния с 1-деокси-1-(метиламино)-D-глицитоловой солью (3β,5β,7α,12α)-3-[[[бис[2-[бис(карбоксиметил)амино]этил]амино]ацетил]амино]-7,12-дигидроксишолан-24-овой кислоты (1:2)

11,3 г Соединения, полученного на стадии В) (13,8 ммоль), суспендируют в 40 мл H_2O и растворяют добавлением 44,7 мл 1М водного раствора меглумина (44,7 ммоль) вплоть до pH 6. К смеси добавляют по каплям 13,7 мл 1М водного раствора GdCl_3 (13,7 ммоль) в течение 1 часа, поддерживая pH 6,5 добавлением 73,5 мл 1М водного раствора меглумина (73,5 ммоль). Осуществляют нанофильтрацию реакционной смеси и доводят pH до 6,8 добавлением 0,3 мл 0,1 М меглумина. После выпаривания и сушки получают нужный продукт (17,2 г; 12,9 ммоль).

Выход: 93% Т.пл. 245-249°C (с разл.)

Свободный лиганд: < 0,1% (0,001 М GdCl_3)

ВЭЖХ анализ: 100% (площадь, %)

Неподвижная фаза: Lichrospher 100 RP-8 5 мкм; 250 × 4 мм колонка Merck KGaA

Температура: 40°C

Подвижная фаза: изократическое элюирование предварительно смешанной фазой: 1 г н-октиламина и 0,3 ммоль Na_2EDTA добавляют к 260 мл CH_3CN и 740 мл H_2O

Раствор буферизируют до pH 7 добавлением H_3PO_4

Скорость потока: 1 мл/мин

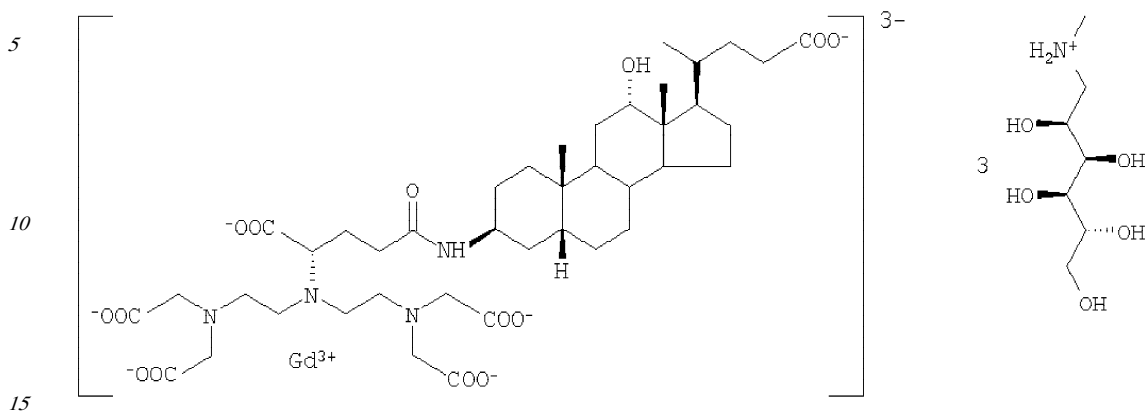
Детектирование (УФ): 210 нм

Элементный анализ	C	H	Gd	N
% вычислено:	47,05	7,06	11,84	6,33
% найдено:	45,19	7,21	11,22	6,07 H_2O 4,16

Спектры ИК и МС соответствуют указанной структуре.

ПРИМЕР 4

Комплекс гадолиния с 1-деокси-1-(метиламино)-D-глицитоловой солью [3β(S),5β,12α]-3-[[4-[бис[2-[бис(карбоксиметил)амино]этил]амино]-4-карбокси-1-оксобутил]амино]-12-гидроксихолан-24-овой кислоты (1:3):



А) Метилловый эфир [3β(S),5β,12α]-3-[[4-[бис[2-[бис[2-(1,1-диметилэтоксид)-2-оксоэтил]амино]этил]амино]-5-(1,1-диметилэтоксид)-1,5-диоксопентил]амино]-12-гидроксихолан-24-овой кислоты

Триэтиламин (2,23 г; 22 ммоль) добавляют к раствору 8,93 г метилового эфира (3β,5β,12α)-3-амино-12-гидроксихолан-24-овой кислоты (полученного аналогично производному холевой кислоты, описанному в WO-A-95/32741: пример 5) (22 ммоль), 16,41 г 1-(1,1-диметилэтилового) сложного эфира N,N-бис[2-[бис[2-(1,1-диметилэтоксид)-2-оксоэтил]амино]этил]-L-глутаминовой кислоты (полученного как описано в WO-A-95/32741: пример 15) (22 ммоль) и 3,91 г диэтилцианофосфоната (24 ммоль) в 300 мл ДМФ при 0°C. Через 1,5 часа при 0°C и 18 часов при комнатной температуре реакционную смесь выпаривают и остаток растворяют в EtOAc. Раствор промывают насыщенным водным раствором NaHCO₃ и H₂O, сушат (Na₂SO₄) и выпаривают. Сырой продукт очищают с помощью флэш-хроматографии, получая нужный продукт (20,67 г; 18,2 ммоль).

Выход: 83%

$[\alpha]^{20}_D = -6,75$ (с 2,0, CHCl₃)

Элементный анализ	C	H	N
% вычислено:	65,69	9,60	4,94
% найдено:	66,54	9,95	4,99

ТСХ: Неподвижная фаза: пластина силикагеля 60F 254 Merck

Элюент: 1:1 н-гексан/EtOAc R_f = 0,09

Детектирование: Ce(SO₄)₂·4H₂O (0,18%) и (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O (3,83%) в 10% H₂SO₄

Спектры ¹H-ЯМР, ¹³C-ЯМР, ИК и МС соответствуют указанной структуре.

В) [3β(S),5β,12α]-3-[[4-[бис[2-[бис(карбоксиметил)амино]этил]амино]-4-карбокси-1-оксобутил]амино]-12-гидроксихолан-24-овая кислота

Соединение, полученное на стадии А) (19,72 г; 17,4 ммоль), растворяют в 105 мл CF₃CO₂H при комнатной температуре. Через 26 часов раствор выпаривают и остаток обрабатывают H₂O; твердую часть отфильтровывают, промывают H₂O и частично сушат в вакууме. Полученное промежуточное соединение суспендируют в H₂O и растворяют 1 М NaOH до pH 13. Через 5 часов при комнатной температуре по каплям добавляют 0,5 М HCl в раствор вплоть до pH 1,4. Через 15 часов при комнатной температуре осадок отфильтровывают, промывают H₂O и сушат, получая сырой продукт, который очищают хроматографически на колонке со смолой Amberlite® XAD

1600 с получением нужного продукта (9,92г; 11,8 ммоль).

Выход: 68% Т. пл. 184°C (с разл.)

Комплексометрический титр (0,1 М GdCl₃): 99,3%

Кислотный титр (0,1 н. NaOH): 99,8%

[α]²⁰_D (с 2,0; 1М NaOH)

5

10

λ(нм)	589	578	546	436	405	365
[α]	+23,61	+24,59	+27,90	+46,67	+55,61	+71,40
Элементный анализ	C		H		N	
% вычислено:	58,70		7,93		6,68	
% найдено:	58,22		8,16		6,59 H ₂ O 0,70%	

ТСХ: Неподвижная фаза: пластина силикагеля 60F 254 Merck

Элюент: 5:4:2 CHCl₃/MeOH/25% NH₄OH R_f=0,13

Детектирование: Ce(SO₄)₂·4H₂O (0,18%) и (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O (3,83%) в 10% H₂SO₄

Спектры ¹H-ЯМР, ¹³C-ЯМР, ИК и МС соответствуют указанной структуре.

С) Комплекс гадолиния с 1-деокси-1-(метиламино)-D-глицитоловой солью [3β(S),5β,12α)-3-[[4-[бис[2-[бис(карбоксиметил)амино]этил]амино]-4-карбокси-1-оксобутил]амино]-12-гидроксиолан-24-овой кислоты (1:3)

20

Соединение, полученное на стадии В) (8,39 г; 10 ммоль), суспендируют в H₂O (30 мл) и растворяют добавлением 1 М водного раствора меглумина (36,5 мл; 36,5 ммоль) вплоть до рН 6. К смеси добавляют по каплям 1,025 М водный раствор GdCl₃ (9,85 мл; 10,1 ммоль) в течение 1 часа, поддерживая рН 6 добавлением 1 М водного раствора меглумина (19,3 мл; 19,3 ммоль). Осуществляют наночелчтрацию раствора и рН доводят до 7,0 1 М водным раствором меглумина. После выпаривания и сушки получают нужный продукт (8,57 г; 5,4 ммоль).

25

Выход: 54% Т. пл.: 150-166°C (170°C разл.)

30

Элементный анализ	C	H	N	Gd
% вычислено:	47,17	7,28	6,21	9,96
% найдено:	43,40	7,31	5,68	9,31 H ₂ O 7,14%

Спектры ИК и МС соответствуют указанной структуре.

35

D) Аналогично соединению, полученному на стадии С), получают комплекс гадолиния с натриевой солью [3β(S),5β,12α)-3-[[4-[бис[2-[бис(карбоксиметил)амино]этил]амино]-4-карбокси-1-оксобутил]амино]-12-гидроксиолан-24-овой кислоты (1:3)

Соединение, полученное на стадии В) (26,92 г; 32,08 ммоль), суспендируют в H₂O (100 мл) и растворяют добавлением 2 М NaOH (56 мл; 112 ммоль) до рН 6. К смеси добавляют по каплям 0,512 М водный раствор GdCl₃ (58,2 мл; 29,77 ммоль) в течение 3 часов, поддерживая рН 6 добавлением 2 М NaOH (28,95 мл; 57,9 ммоль). Доводят рН раствора до 6,7 добавлением 2 М NaOH (4мл, 8 ммоль) и осуществляют наночелчтрацию раствора. После сушки вымораживанием получают нужный продукт (29,86 г, 28,2 ммоль).

40

45

Выход: 88% Т.пл.: > 300°C

50

Элементный анализ	C	H	N	Gd	Na
% вычислено:	46,49	5,71	5,29	14,85	6,51
% найдено:	43,98	6,34	4,92	13,86	6,61 H ₂ O 4,63%

Спектры ИК и МС соответствуют указанной структуре.

ПРИМЕР 5

Альтернативный способ получения [3β(S),5β,12α]-3-[[4-[бис[2-
[бис(карбоксиметил)амино]этил]амино]-4-карбокси-1-оксобутил]амино]-12-
5 гидроксихолан-24-овой кислоты в соответствии со схемой 3

А) 2-Метил-1-(фенилметиловый) диэфир (S)-5-оксо-1,2-пирролидинкарбоновой
кислоты

7,1 г CH₃I (50 ммоль) добавляют к раствору 6,58 г 1-(фенилметилового) эфира (S)-5-
оксо-1,2-пирролидинкарбоновой кислоты (25 ммоль) и N,N-
10 диизопропилэтиламина (3,55 г; 27,5 ммоль) в CH₂Cl₂ (33 мл) и реакционную смесь
кипятят с обратным холодильником в течение 6,5 часов. После охлаждения до
комнатной температуры и разбавления CH₂Cl₂ (50 мл) реакционную смесь промывают
H₂O, 2% водным Na₂CO₃, 0,2 М HCl и H₂O. После сушки над Na₂SO₄ и выпаривания
15 получают нужный продукт (6,8 г; 24,5 ммоль).

Выход: 98%

ВЭЖХ анализ: 98,5 % (площадь, %)

Неподвижная фаза: Lichrosorb RP-Select B 5 мкм; 250 × 4 мм колонка Merck KGaA

Температура: 45°C

20 Подвижная фаза: градиентное элюирование

A = 0,017 М H₃PO₄ в воде

B = CH₃CN

Градиент:

25	мин	%A	%B
	0	80	20
	15	80	20
	35	40	60

30 Скорость потока: 1 мл/мин

Детектирование (УФ): 210 нм

[α]²⁰ λ = (с 2; CHCl₃)

35	λ(нм)	589	578	546	365
	[α]	-42,97	-44,79	-50,09	-100,43
	Элементный анализ	C	H	N	
	% вычислено:	60,64	5,45	5,05	
	% найдено:	60,94	5,54	5,00	

40 Спектры ¹H-ЯМР, ¹³C-ЯМР, ИК и МС соответствуют указанной структуре.

В) Метиловый эфир [3β(S),5β,12α]-3-[[5-метокси-1,5-диоксо-4-
[[фенилметокси)карбонил]амино]пентил]амино]-12-гидроксихолан-24-овой кислоты

8,92 г Метилового эфира (3β,5β,12α)-3-амино-12-гидроксихолан-24-овой кислоты
(полученного аналогично производному холевой кислоты, описанному в WO-A-
45 95/32741: пример 5) (22 ммоль) добавляют к раствору соединения А) (6,1 г; 22 ммоль) в
диоксане (55 мл) и полученную смесь нагревают до 50°C в течение 24 часов, затем
до 105°C в течение 29 часов. Растворитель выпаривают при пониженном давлении и
остаток очищают с помощью флэш-хроматографии (градиентное элюирование
50 EtOAc/н-гексан) с последующей кристаллизацией из смеси 1:1 EtOAc/н-гексан, получая
нужный продукт (11,2 г; 16,4 ммоль).

Выход: 75%. Т.пл.: 140°C

ВЭЖХ анализ: 99,2% (площадь, %)

Неподвижная фаза: Lichrosorb RP-Select B 5 мкм; 250 × 4 мм колонка Merck KGaA

Температура: 45°C

Подвижная фаза: градиентное элюирование

A = 0,017 М Н₃РO₄ в воде

B = СН₃СN

Градиент:

мин	%A	%B
0	65	35
25	15	85
30	15	85

Скорость потока: 1 мл/мин

Детектирование (УФ): 210 нм

$[\alpha]^{20}_\lambda = (c \cdot 2,01; \text{CHCl}_3)$

λ (нм)	589	578	546	365
$[\alpha]$	+24,14	+25,13	+28,51	+73,81

Элементный анализ	C	H	N
% вычислено:	68,70	8,43	4,11
% найдено:	69,36	8,72	4,13

ТСХ: неподвижная фаза: пластина силикагеля 60F 254 Merck

Элюент: EtOAc

Детектирование: Ce(SO₄)₂·4H₂O (0,2%) и (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O (3,8%) в 10% H₂SO₄ R_f= 0,11

Спектры ¹H-ЯМР, ¹³C-ЯМР, ИК и МС соответствуют указанной структуре.

С) Метилловый эфир [3β(S),5β,12α]-3-[[4-[бис[2-[бис[2-(1,1-диметилэтокси)-2-оксоэтил]амино]этил]амино]-5-метокси-1,5-диоксопентил]амино]-12-гидроксихолан-24-овой кислоты

1 г 5% Pd/C добавляют к раствору соединения В) (10,4 г; 15,3 ммоль) в MeOH (100 мл); суспензию перемешивают в течение 3,5 часов в атмосфере водорода (поглощено H₂: 348 мл; 15,5 ммоль) при комнатной температуре. После фильтрования через фильтр Millipore® FH (0,45 мкм) раствор выпаривают при пониженном давлении, получая остаток, который растворяют в СН₃СN (60 мл). Добавляют 2 М водный (рН 8) фосфатный буфер (60 мл), затем раствор 1,1-диметилэтилового эфира N-(2-бромэтил)-N-[2-(1,1-диметилэтокси)-2-оксоэтил]глицина (полученного по способу, раскрытому в WO-A-95/32741: пример 15) (11,86 г; 33,7 ммоль) в СН₃СN (15 мл) добавляют по каплям в течение 10 минут при комнатной температуре. Смесь перемешивают в течение 39 часов. После разделения органическую фазу выпаривают при пониженном давлении и остаток растворяют в AcOEt (200 мл). Раствор промывают H₂O, сушат (Na₂SO₄) и выпаривают. Сырой продукт очищают с помощью флэш-хроматографии (градиентное элюирование EtOAc/н-гексан), получая нужный продукт (11,36 г; 10,4 ммоль).

Выход: 68%. Т. пл.: 55-58°C

ВЭЖХ анализ: 100% (площадь, %)

$[\alpha]^{20}_\lambda = (c \cdot 2,01; \text{CHCl}_3)$

λ (нм)	589	578	546	365
----------------	-----	-----	-----	-----

[α]	-6,97	-7,41	-8,61	-32,89
Элементный анализ		C	H	N
% вычислено:		64,93	9,42	5,13
% найдено:		65,06	9,36	5,11

5

ТСХ: Неподвижная фаза: пластина силикагеля 60F 254 Merck

Элюент: EtOAc

Детектирование: $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,2%) и $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (3,8%) в 10% H_2SO_4 $R_f = 0,45$

10

Спектры ^1H -ЯМР, ^{13}C -ЯМР, ИК и МС соответствуют указанной структуре.

D) [3β(S),5β,12α)-3-[[4-[бис[2-[бис(карбоксиметил)амино]этил]амино]-4-карбокси-1-оксобутил]амино]-12-гидроксиолан-24-овая кислота

15

К раствору соединения C) (8,5 г; 7,8 ммоль) в диоксане (50 мл) добавляют 2М водный раствор LiOH (117 мл; 234 ммоль). Полученную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 72 часов, затем подкисляют до pH 6, медленно добавляя 37% HCl. Раствор концентрируют до 50 г, упаривая при пониженном давлении, и разбавляют H_2O (40 мл). Раствор подкисляют до pH 2,5 добавлением 37% HCl, нагревают до 50-55°C и при интенсивном перемешивании очень медленно подкисляют до pH 1,3, добавляя 2 н HCl. Через 5 минут гетерогенную смесь оставляют для медленного охлаждения до комнатной температуры при перемешивании на 15 часов. Осадок отфильтровывают, промывают H_2O , и сушат, получая нужный продукт (5,92 г; 7 ммоль).

25

Выход: 90% Т.пл. 180-198°C

ВЭЖХ анализ: 99,9% (площадь, %)

Неподвижная фаза: Zorbax ECLIPSE XDB-C8 3,5 мкм; 150 × 4,6 мм колонка Rockland Technologies Inc.

Температура: 40°C

30

Подвижная фаза: градиентное элюирование

A = 0,017 М H_3PO_4 , 0,3 мМ EDTA в воде

B = CH_3CN

Градиент:

35

мин	%A	%B
0	85	15
40	65	35
50	65	35

40

Скорость потока: 1,5 мл/мин

Детектирование (УФ): 210 нм

Кислотный титр (0,1 н. NaOH): 99%

$[\alpha]^{20}_D \lambda$ (с 2,04; 1 н NaOH)

45

λ(нм)	589	578	546	436	405	365
[α]	+24,80	+25,83	+29,22	49,02	+58,43	+75,59
Элементный анализ		C	H	N	Cl	Li
% вычислено:		58,70	7,93	6,68		
% найдено:		57,90	7,97	6,57	<0,1 H_2O 0,95	<0,1

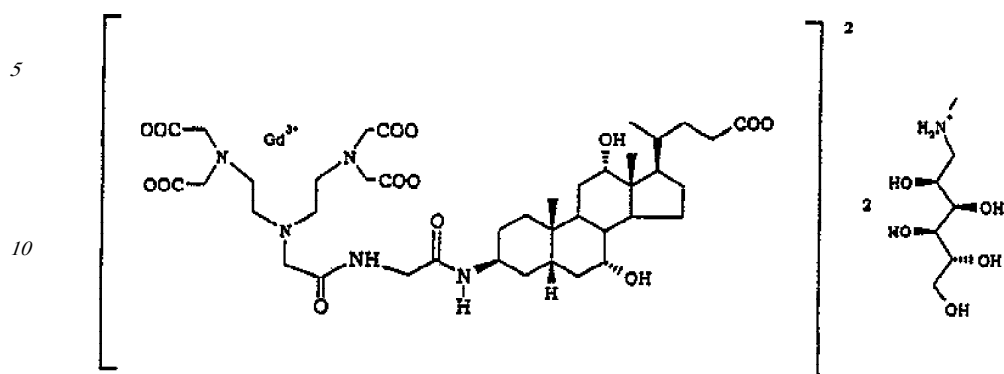
50

Спектры ^1H -ЯМР, ^{13}C -ЯМР, ИК и МС соответствуют указанной структуре.

ПРИМЕР 6

Комплекс гадолиния с 1-деокси-1-(метиламино)-D-глицитоловой солью

(3 β ,5 β ,7 α ,12 α)-3-[[[[[бис[2-[бис(карбоксиметил)амино]этил]амино]ацетил]амино]ацетил]амино]-7,12-дигидроксихолан-24-овой кислоты (1:2):



15 А) N-[[бис[2-[бис[2-(1,1-диметилэтокси)-2-оксоэтил]амино]этил]амино]ацетил]глицин
6,5 г глицилглицина (49,3 ммоль) суспендируют в 100 мл смеси 1:1 H₂O/EtOH и
растворяют при pH 10, добавляя 10 М NaOH (4,8 мл). К этому добавляют по
каплям 1,1-диметилэтиловый эфир N-(2-бромэтил)-N-[2-(1,1-диметилэтокси)-2-
20 оксоэтил]глицина (42 г; 110,9 ммоль) в 40 мл EtOH в течение 2 часов, поддерживая
pH 10,5 добавлением 10 М NaOH (5,8 мл). Раствор быстро превращается в эмульсию,
которую растворяют через 2,5 часа добавлением 10 М NaOH. Через 22 часа
растворитель выпаривают, смесь разбавляют водой и экстрагируют CH₂Cl₂.
Органическую фазу промывают H₂O, сушат и выпаривают, получая остаток, который
25 очищают с помощью флэш-хроматографии. Остаток растворяют в воде, доводят pH
до 4,5 добавлением 1 М HCl и раствор экстрагируют хлороформом. Органическую
фазу промывают H₂O, сушат и выпаривают, получая 13 г нужного продукта (19,3
ммоль).

30 **Выход: 39%**

Элементный анализ	C	H	N
% вычислено:	56,95	8,66	8,30
% найдено:	56,67	8,68	8,30

35 ТСХ: Неподвижная фаза: пластина силикагеля 60F 254 Merck
Элюент: 6:3:1 CHCl₃/MeOH/25% NH₄OH R_f=0,65
Детектирование: 1% KMnO₄ в 1 М NaOH

Спектры ¹H-ЯМР, ¹³C-ЯМР, ИК и МС соответствуют указанной структуре.

40 В) Метилловый эфир (3 β ,5 β ,7 α ,12 α)-3-[[[[[бис[2-[бис[2-(1,1-диметилэтокси)-2-
оксоэтил]амино]этил]амино]ацетил]амино]ацетил]амино]-7,12-дигидроксихолан-24-
овой кислоты

2,8 мл ТЕА (триэтанолламин) (20,2 ммоль) добавляют по каплям за 5 минут к
раствору, содержащему 13,6 г соединения, полученного на стадии А) (20,2 ммоль), 8,52
45 г метилового эфира (3 β ,5 β ,7 α ,12 α)-3-амино-7,12-дигидроксихолан-24-овой
кислоты (20,2 ммоль) и DEPC (3,4 мл; 22,2 ммоль) в ДМФ (290 мл), перемешиваемому
при 0°C. Через 1 час реакционную смесь нагревают до комнатной температуры и
раствор перемешивают в течение 6,5 часов. Добавляют 0,3 мл DEPC (2 ммоль) и
50 раствор перемешивают еще 15,5 часов. ДМФ выпаривают, остаток растворяют
в EtOAc, промывают водным NaHCO₃, и, наконец, сушат. После очистки с помощью
флэш-хроматографии получают 13,7 г нужного продукта. (12,7 ммоль)

Выход: 63%

$[\alpha]^{20}_D = +5,26$ (с 1,5; CHCl_3)

Элементный анализ	C	H	N
% вычислено:	63,48	9,25	6,49
5 % найдено:	63,22	9,40	6,40

Спектры ^1H -ЯМР, ^{13}C -ЯМР, ИК и МС соответствуют указанной структуре.

С) (3 β ,5 β ,7 α ,12 α)-3-[[[[бис[2-[бис(карбоксиметил)амино]этил]амино]ацетил]амино]ацетил]амино]-7,12-дигидроксихолан-24-овая кислота

10 12,85 г Соединения, полученного на стадии В) (12 ммоль), растворяют в ТФУ (210 мл), перемешиваемой при $-5/0^\circ\text{C}$. Через 16 часов ТФУ выпаривают, получая остаток, который растворяют в 90 мл 0,8 М NaOH при pH 13, и перемешивают при комнатной температуре в течение 15 часов. Раствор концентрируют до 50 мл, прикапывают в 105
15 мл 0,6 М HCl и перемешивают в течение 2 часов. Твердую часть отфильтровывают, промывают 0,1 М HCl и сушат, получая сырой продукт, который очищают с помощью флэш-хроматографии. Фракции, содержащие нужное соединение в форме соли, выпаривают, получая остаток, который растворяют в воде, и прикапывают в 1 М HCl, поддерживая pH 1,45. Осадок отфильтровывают, промывают 0,1 М HCl и сушат,
20 получая 2,6 г нужного продукта (3,1 ммоль).

Выход: 26% Т. пл.: $120-125^\circ\text{C}$

ВЭЖХ анализ: 98 % (площадь, %)

Спектры ^1H -ЯМР, ^{13}C -ЯМР, ИК и МС соответствуют указанной структуре.

25 D) Комплекс гадолиния с 1-деокси-1-(метиламино)-D-глицитоловой солью (3 β ,5 β ,7 α ,12 α)-3-[[[[бис[2-[бис[2-(карбоксиметил)амино]этил]амино]ацетил]амино]ацетил]амино]-7,12-дигидроксихолан-24-овой кислоты (1:2)

2,59 г Соединения, полученного на стадии С) (3,08 ммоль), суспендируют в воде (20 мл) и растворяют, добавляя 1 М водный раствор меглумина (3,08 мл, 3,08 ммоль) до
30 pH 5. К смеси добавляют Gd_2O_3 (0,501 г; 2,77 ммоль), нагревая до 50°C . Через 1 час добавляют 1 М меглумин (2,8 мл; 2,8 ммоль) для растворения осадка. Через 24 часа реакционную смесь фильтруют и доводят pH до 6,8 добавлением 1 М водного меглумина (0,4 мл). После выпаривания и сушки получают 4,2 г (3,00 ммоль) нужного
35 продукта.

Выход: 99%. Т. пл.: $209-213^\circ\text{C}$ (с разл.).

ВЭЖХ анализ: 99,7% (площадь, %)

Свободный лиганд: $<0,1\%$ (0,001 GdCl_3)

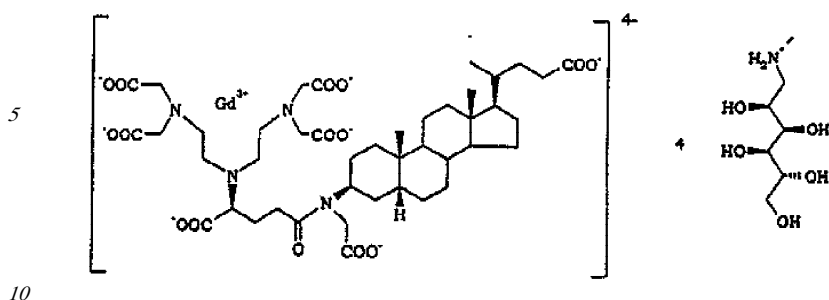
Элементный анализ	C	H	N	Gd
% вычислено:	46,84	6,99	7,08	11,36
40 % найдено:	44,01	7,35	6,68	10,39 H_2O 4,95

Спектры ИК и МС соответствуют указанной структуре.

45 ПРИМЕР 7

Комплекс гадолиния с 1-деокси-1-(метиламино)-D-глицитоловой солью [3 β (S),5 β]-3-[[4-[бис[2-[бис(карбоксиметил)амино]этил]амино]-4-карбокси-1-оксобутил] (карбоксиметил)амино]холан-24-овой кислоты (1:4):

50



А) Метилловый эфир (3 β ,5 β)-3-[[2-(1,1-диметилэтоксн)-2-оксоэтил]амнно]холан-24-овой кнслоты

40 г Метнлового эфира (3 β ,5 β)-3-амннохолан-24-овой кнслоты (полученного ранее в примере 1) (103 ммоль) суспенднруют в ДМФ (1,0 л) при комнатной температуре в атмосфере азота. Добавляют трнэтиламин (13,0 г; 129 ммоль), затем к реакционной смеси добавляют по каплям раствор 1,1-днметнлэтилового эфира бромуксусной кнслоты (24,0 г; 123 ммоль) в ДМФ (30 мл) в течение 1 часа до растворения. Через 3 дня смесь концентрнруют и разбавляют 4% водным раствором NaHCO₃. Полученную суспензню фнльтруют, осадок промывают H₂O и сушат, получая 33,7 г (66,9 ммоль) нужного продукта.

Выход: 65%. Т.пл.: 62-64°C

[α]²⁰_D = + 23,55 (с 1,96, MeOH)

Элементный анализ	C	H	N
% вычислено:	73,91	10,60	2,78
% найдено:	74,67	10,85	2,78 H ₂ O < 0,1

ТСХ: Неподвнжная фаза: пластнна силнкагеля 60F 254 Merck

Элюент: 7:3 н-гексан/EtOAc R_f = 0,31

Спектры ¹H-ЯМР, ¹³C-ЯМР, ИК и МС соответствуют указанной структуре.

В) Метнловый эфир [3 β (S),5 β]-3-[[4-[бнс[2-[бнс[2-(1,1-днметнлэтоксн)-2-оксоэтил]амнно]этил]амнно]-5-(1,1-днметнлэтоксн)-1,5-дноксопентнл][2-(1,1-днметнлэтоксн)-2-оксоэтил]амнно]холан-2 4-овой кнслоты

Днзопропнлэтиламин (19,5 г; 15.1 ммоль) добавляют по каплям за 20 минут к раствору соединения А) (33,0 г; 65,5 ммоль), 1-(1,1-днметнлэтилового) эфира N,N-бнс[2-[бнс[2-(1,1-днметнлэтоксн)-2-оксоэтил]амнно]этил]-L-глутамнновой кнслоты (полученного как описано в WO-A-95/32741: пример 15) (53,8 г;

72,1 ммоль) и гексафторфосфата (бензотрнazol-1-илоксн)трнс(днметнлаамнно)фосфонн (ВОР) (40,6 г; 91,8 ммоль) в ДМФ (400 мл), перемешнваемому при комнатной температуре в атмосфере азота. Через 2 дня реакционную смесь концентрнруют и поглощают EtOAc. Раствор промывают H₂O, сушат (Na₂SO₄) и выпаривают. Сырой продукт дважды очнщают с помощью флэш-хроматографнн, получая нужный продукт (38,7 г; 31,4 ммоль).

Выход: 48%

[α]²⁰_D = -54,50 (с 2:51, CHCl₃)

ТСХ: Неподвнжная фаза: пластнна силнкагеля 60F 254 Merck

Элюент: 7:3 н-гексан/EtOAc R_f = 0,22

Спектры ¹H-ЯМР, ¹³C-ЯМР, ИК и МС соответствуют указанной структуре.

С) [3 β (S),5 β]-3-[[4-[бнс[2-[бнс(карбокснметнл)амнно]этил]амнно]-4-карбоксн-1-

оксобутил](карбоксиметил)амино]холан-24-овая кислота

В раствор соединения, полученного на стадии В) (38,7 г; 31,4 ммоль), в EtOH (350 мл), перемешиваемый при комнатной температуре, по каплям добавляют 500 мл 2 М раствора LiOH в течение 1 часа. Через 16 часов реакционную смесь концентрируют до 500 мл и снова добавляют 2 М раствор LiOH (350 мл), нагревая до 50°C. Через 24 часа реакционную смесь охлаждают до комнатной температуры и добавляют по каплям в 320 мл 6 М HCl, интенсивно перемешивая при 5°C. pH полученной суспензии доводят до 1,0, добавляя 55 мл 2 М NaOH. Твердую часть отфильтровывают, промывают 0,1 М HCl и сушат. Сырой продукт суспендируют в H₂O и солюбилизируют добавлением 1 М раствора NaOH, затем основной раствор добавляют по каплям в 0,5 М раствор HCl. Осадок отфильтровывают, промывают 0,05 М HCl, H₂O и сушат, получая 23,5 г нужного продукта (26,7 ммоль).

Выход: 85% Т. пл.: 178-182°C

$[\alpha]_{20}^{405} = +24,10$ (с 1,49, 1М NaOH)

ВЭЖХ анализ: 100% (площадь, %)

Неподвижная фаза: Nupurity Elite C-18 5 мкм; колонка 250 × 4,6 мм

Температура: 40°C

Подвижная фаза: градиентное элюирование;

A = 0,01 М KН₂РO₄, 0,3 мМ EDTA в воде

B = CH₃CN

Градиент:

мин	%A	%B
0	95	5
40	65	35
50	65	35

Скорость потока: 1 мл/мин

Детектирование (УФ): 210 нм

Элементный анализ	C	H	N	Na	Cl
% вычислено:	58,62	7,78	6,36		
% найдено:	57,71	8,07	6,20	0,13	0,55 H ₂ O<0,1

Спектры ¹H-ЯМР, ¹³C-ЯМР, ИК и МС соответствуют указанной структуре.

D) Комплекс гадолиния с 1-деокси-1-(метиламино)-D-глицитоловой солью [3β(S),5β]-3-[[4-[бис[2-[бис(карбоксиметил)амино]этил]амино]-4-карбокси-1-оксобутил](карбоксиметил)амино]холан-24-овой кислоты (1:4)

К суспензии соединения, полученного на стадии С) (12,9 г; 14,6 ммоль) в H₂O (100 мл) добавляют 1 М водный раствор меглумина (72,0 мл; 72,0 ммоль) при комнатной температуре до получения прозрачного раствора с pH 6,2. К смеси добавляют по каплям 0,393 М водный раствор GdCl₃ (37,2 мл; 14,6 ммоль), поддерживая pH 6,2 добавлением 1 М водного раствора меглумина (30,0 мл; 30,0 ммоль) с помощью pH-stat. В конце добавлений реакционную смесь фильтруют через бумагу, затем через мембрану Millipore® (NAWP 0,45 мкм), осуществляют нанофильтрацию раствора, доводят pH до 7,0, добавляя 1 М водный раствор меглумина (0,20 мл; 0,20 ммоль), и выпаривают. Твердую часть сушат, получая нужный продукт (24,0 г; 13,2 ммоль).

Выход: 91% Т.пл.: 90-92°C

ВЭЖХ анализ: 100% (площадь, %)

Неподвижная фаза: Lichrospher 100 RP-8 5 мкм; колонка Merck KGaA 250 × 4 мм

Температура: 40°C

Подвижная фаза: Изократическое элюирование предварительно смешанной подвижной фазой: 1 г н-октиламина добавляют к 400 мл ацетонитрила и 600 мл воды

Раствор буферируют до pH 6, добавляя H₃PO₄

Скорость потока: 1 мл/мин

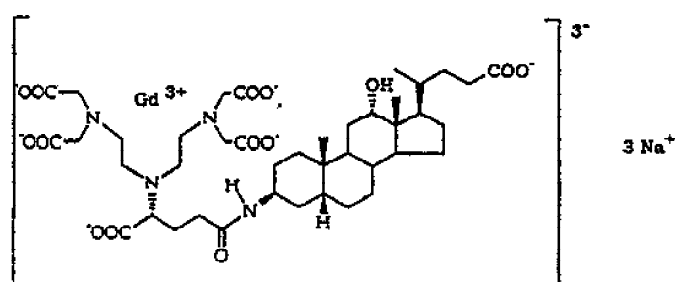
Детектирование (УФ): 210 нм

Элементный анализ	C	H	N	Gd	Na	Cl
% вычислено:	46,96	7,38	6,17	8,66		
% найдено:	44,27	7,59	5,76	8,21 <0,1 H ₂ O	6,61	

Спектры ИК и МС соответствуют указанной структуре.

ПРИМЕР 8

Комплекс гадолиния с натриевой солью [3β(R),5β,12α]-3-[[4-[бис[2-бис(карбоксиметил)амино]этил]амино]-4-карбокси-1-оксобутил]амино]-12-гидроксихолан-24-овой кислоты (1:3):



В соответствии со схемой 3 и экспериментальным способом примера 5 1-(фенилметилловый) эфир (R)-5-оксо-1,2-пирролидинкарбоновой кислоты (коммерчески доступный продукт) эстерифицируют метилиодидом в присутствии N,N-диизопропилэтиламина и полученный таким образом (R) метиловый эфир подвергают взаимодействию с метиловым эфиром (3β,5β,12α)-3-амино-12-гидроксихолан-24-овой кислоты (полученным аналогично производному холевого кислоты, описанному в WO-A-95/32741: пример 5), получая метиловый эфир [3β(R),5β,12α]-3-[[4-[бис[2-(1,1-диметилэтокси)-2-оксоэтил]амино]этил]амино]-5-метокси-1,5-диоксопентил]амино]-12-гидроксихолан-24-овой кислоты. После удаления (H₂/Pd) Cbz защитной группы и алкилирования 1,1-диметилэтиловым эфиром N-(2-бромэтил)-N-[2-(1,1-диметилэтокси)-2-оксоэтил]глицина (полученным по способу, раскрытому в WO-A-95/32741: пример 15) в CH₃CN/фосфатном буфере pH 8, получают гекса(сложный эфир), который превращают (водный LiOH/диоксан) в соответствующую гексакислоту. Образуют комплекс последней по способу примера 4, пункт D), в результате чего получают нужный продукт с общим выходом 44%.

Т.пл.: >300°C

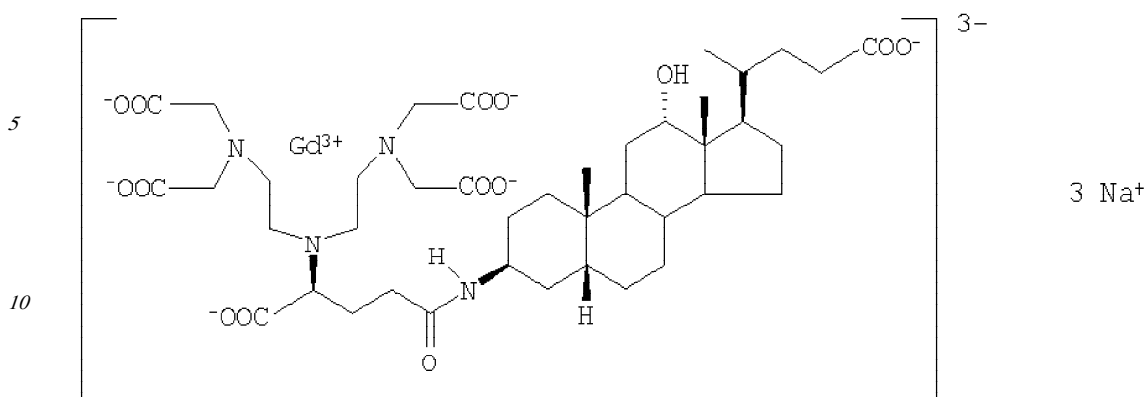
Элементный анализ	C	H	N	Gd	Na
% вычислено:	46,49	5,71	5,29	14,85	6,51
% найдено:	44,02	6,13	5,10	14,09	6,17 H ₂ O 4,50%

Спектры ИК и МС соответствуют указанной структуре.

ПРИМЕР 9

Комплекс гадолиния с натриевой солью [3β(RS),5β,12α]-3-[[4-[бис[2-бис(карбоксиметил)амино]этил]амино]-4-карбокси-1-оксобутил]амино]-12-

гидроксихолан-24-овой кислоты (1:3):



Соединение получают из метилового эфира (3β,5β,12α)-3-амино-12-
 15 гидроксигидроксихолан-24-овой кислоты (полученного аналогично производному холевой
 кислоты, описанному в WO-A-95/32741: пример 5), и 1-(1,1-диметилэтилового)
 эфира N,N-бис[2-[бис[2-(1,1-диметилэтокси)-2-оксоэтил]амино]этил]-DL-глутаминовой
 20 кислоты (полученного из DL глутаминовой кислоты, как описано в WO-A-95/32741:
 пример 15 для L изомера) в соответствии со способом, подробно изложенным в
 примере 4. Продукт получают с общим выходом 61%.

Т.пл.: > 300°C

ВЭЖХ анализ: 99% (площадь, %)

Неподвижная фаза: Zorbax ECLIPSE XDB-C8 3,5 мкм; 150×4,6 мм колонка Rockland
 25 Technologies, Inc.

Температура: 40°C

Подвижная фаза: градиентное элюирование

A=0,005 М КН₂РО₄, 0,005 М К₂НРО₄, 0,3 мМ EDTA в воде

30 B=CH₃CN

Градиент:

мин	%A	%B
0	90	10
5	90	10
35	20	50

Скорость потока: 1,0 мл/мин

Детектирование (УФ): 210 нм.

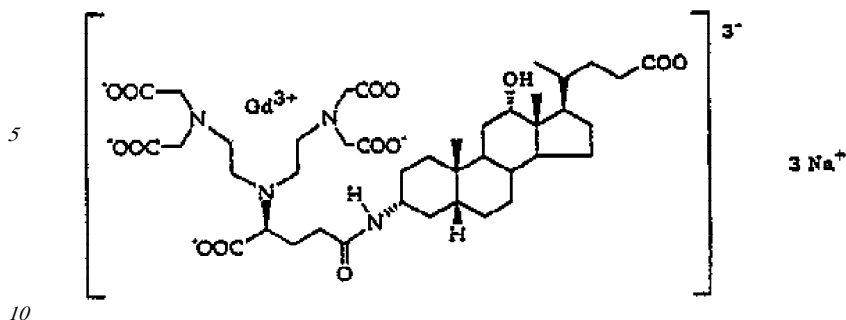
40 Хроматографический метод выявляет два пика, почти равные в процентном
 отношении, которые связаны с диастереоизомерами благодаря наличию RS
 стереоцентра в ДТРА остатке.

Элементный анализ	C	H	N	Gd	Na
% вычислено:	46,49	5,71	5,29	14,85	6,51
45 % найдено:	43,98	6,34	4,98	13,86	6,16 H ₂ O 4,63%

Спектры ИК и МС соответствуют указанной структуре.

ПРИМЕР 10

50 Комплекс гадолиния с натриевой солью [3α(S),5β,12α]-3-[[4-[бис[2-
 [бис(карбоксиметил)амино]этил]амино]-4-карбокси-1-оксобутил]амино]-12-
 гидроксигидроксихолан-24-овой кислоты (1:3):



Метилловый эфир (3 α ,5 β ,12 α)-3-амино-12-гидроксихолан-24-овой кислоты

Метилловый эфир (3 α ,5 β ,12 α)-3,12-дигидроксихолан-24-овой кислоты подвергают взаимодействию в условиях Mitsunobu (Mitsunobu, O. Synthesis 1981, 1-28; Denike, J.K. et al. Chem. Phys. Lipids 1995, 77, 261-267) с трифенилфосфином,

15 диэтилазодикарбоксилатом и муравьиной кислотой в ТГФ, получая сложный метилловый эфир (3 β ,5 β ,12 α)-3-формилокси-12-гидроксихолан-24-овой кислоты.

Удаляют защитные группы (MeOH/HCl) до метилового эфира (3 β ,5 β ,12 α)-3,12-дигидроксихолан-24-овой кислоты, который вводят в ряд реакций, описанных в WO-A-95/32741: пример 5) для получения производного холевой кислоты. Метилловый эфир (3 α ,5 β ,12 α)-3-амино-12-гидроксихолан-24-овой кислоты получают с общим выходом 32%.

Т. пл.: 90-92°C

25 $[\alpha]^{20}_D = + 53,46$ (с 1,3, CH₃OH)

Элементный анализ	C	H	N
% вычислено:	74,03	10,69	3,44
% найдено:	74,20	10,99	3,26

30 ТСХ: Неподвижная фаза: пластина силикагеля 60F 254 Merck

Элюент: 9:1:0,15 CHCl₃/CH₃OH/25% NH₄OH R_f=0,21

Спектры ¹H-ЯМР, ¹³C-ЯМР, ИК и МС соответствуют указанной структуре.

В соответствии с реакционной схемой 3 и экспериментальным способом,

35 представленным в примере 5, 2-метил 1-(фенилметилловый) диэфир (S)-5-оксо-1,2-пирролидин-дикарбоновой кислоты подвергают взаимодействию с соединением А).

Полученный таким образом метилловый эфир [3 α (S),5 β ,12 α]-3-[[4-[бис[2-[бис[2-(1,1-диметилэтокси)-2-оксоэтил]амино]этил]амино]-5-метокси-1,5-диоксопентил]амино]-12-

40 гидроксидхолан-24-овой кислоты гидрируют (H₂/Pd) для удаления Cbz защитной группы. Последующее алкилирование 1,1-диметилэтиловым эфиром N-(2-бромэтил)-N-[2-(1,1-диметилэтокси)-2-оксоэтил]глицина (полученным по способу, раскрытому в WO-A-95/32741: пример 15) в CH₃CN/фосфатном буфере pH 8, приводит к получению гекса(сложного эфира). Последний превращают (водный LiOH/диоксан) в гексакислоту, которую комплексуот по способу примера 4, пункт D), получая нужный продукт с полным выходом 33%.

Т. пл.: > 300°C

ВЭЖХ анализ 100% (площадь, %)

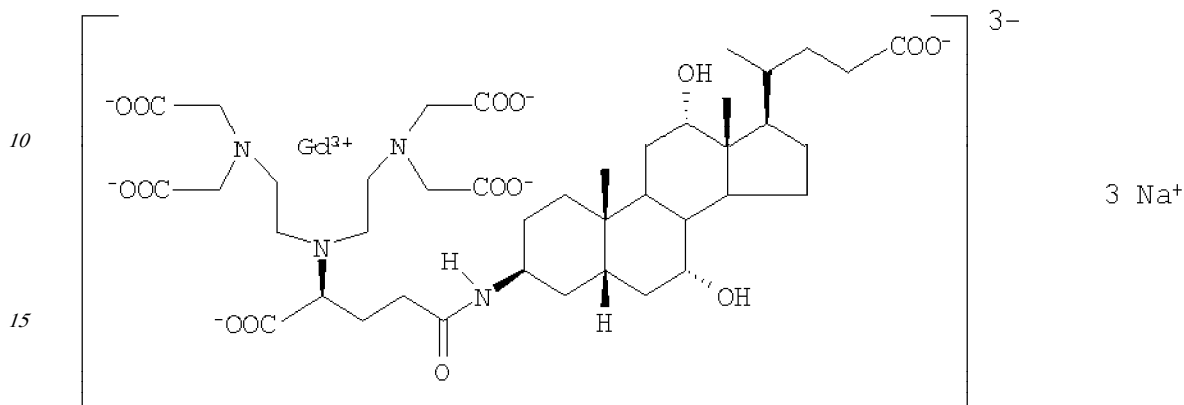
50

Элементный анализ	C	H	N	Gd	Na		
% вычислено:	46,49	5,71	5,29	14,85	6,51		
% найдено:	42,04	6,37	4,76	13,28	5,91	H ₂ O	9,79

Спектры ИК и МС соответствуют указанной структуре.

ПРИМЕР 11

Комплекс гадолиния с натриевой солью [3β(S),5β,7α]-3-[[4-[бис[2-
5 [бис(карбоксиметил)амино]этил]амино]-4-карбокси-1-оксобутил]амино]-7-
гидроксихолан-24-овой кислоты (1:3):



Соединение получают из метилового эфира (3β,5β,7α)-3-амино-7-гидроксихолан-24-
20 овой кислоты (полученного аналогично производному холевой кислоты, описанному
в WO-A-95/32741: пример 5) и 1-(1,1-диметилэтилового) эфира N/N-бис[2-[бис[2-(1,1-
диметилэтокси)-2-оксоэтил]амино]этил]-L-глутаминовой кислоты (полученного как
описано в WO-A-95/32741: пример 15) по способу, подробно изложенному в примере 4.
25 Продукт получают с общим 89% выходом.

Т.пл.: > 300°C

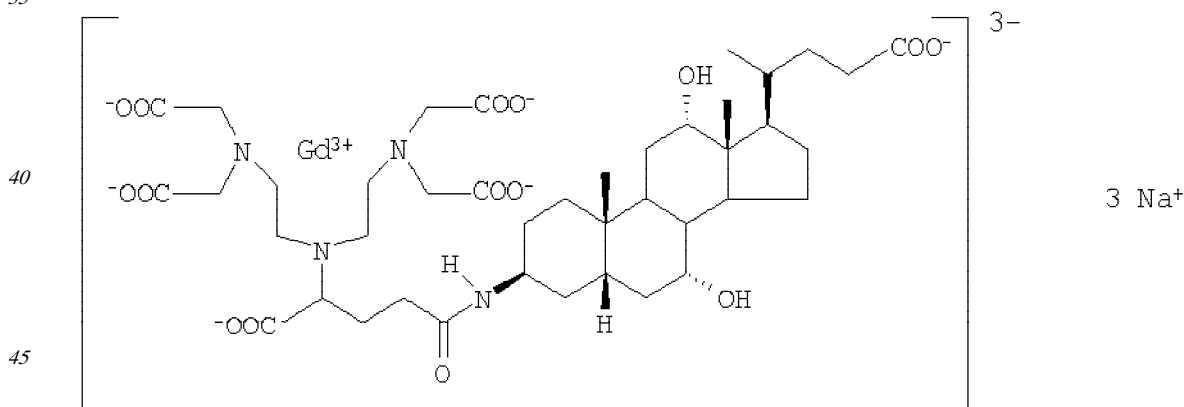
Элементный анализ	C	H	N	Gd	Na		
% вычислено:	46,49	5,71	5,29	14,85	6,51		
% найдено:	43,88	6,50	4,91	13,62	6,04	H ₂ O	7,11%

30

Спектры ИК и МС соответствуют указанной структуре.

ПРИМЕР 12

[3β(RS),5β,7α,12α]-3-[[4-[бис[2-[бис(карбоксиметил)амино]этил]амино]-4-карбокси-1-
35 оксобутил]амино]-7,12-дигидроксихолан-24-овая кислота



Соединение получают из метилового эфира (3β,5β,7α,12α)-3-амино-7,12-
дигидроксихолан-24-овой кислоты (полученного как описано в WO-A-95/32741:
50 пример 5) и 1-(1,1-диметилэтилового) эфира N,N-бис[2-[бис[2-(1,1-диметилэтокси)-2-
оксоэтил]амино]этил]-DL-глутаминовой кислоты (полученного из DL глутаминовой
кислоты, как описано в WO-A-95/32741: пример 15 для L изомера) по способу,
подробно изложенному в примере 4 для получения соединения В). Продукт получают

с общим 65% выходом.

Т. пл.: 224°C (с разложением)

ВЭЖХ анализ: 97% (площадь, %)

Неподвижная фаза: Zorbax ECLIPSE XDB-C8 3,5 мкм; 150×4,6 мм колонка Rockland
Technologies, Inc.

Температура: 40°C

Подвижная фаза: градиентное элюирование

A = 0,017 М Н₃РO₄, 0,3 мМ EDTA в воде

B = CH₃CN

Градиент:

мин	%A	%B
0	95	5
40	65	35
50	65	35

Скорость потока: 1,0 мл/мин

Детектирование (УФ): 210 нм

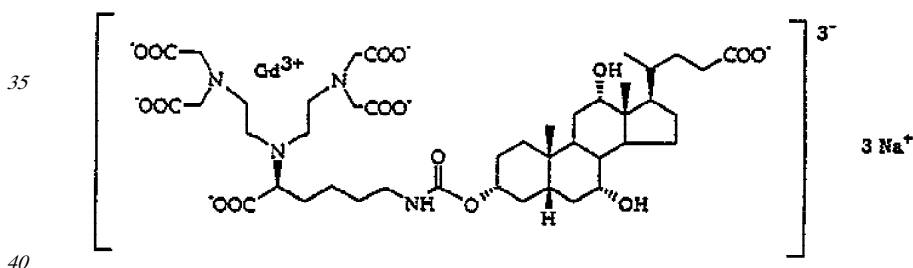
Хроматографический метод выявляет два пика, в почти равном процентном отношении, которые связаны с диастереоизомерами благодаря наличию RS стереоцентра у ДТРА остатка.

Элементный анализ	C	H	N	Li, Cl
% вычислено:	57,60	7,78	6,55	
% найдено:	54,34	7,82	6,19	<0,1 H ₂ O 5,12%

Спектры ИК, ЯМР и МС соответствуют указанной структуре.

ПРИМЕР 13

Комплекс гадолиния с натриевой солью [3α(S),5β,7α,12α]-3-[[[5-[бис[2-бис(карбоксиметил)амино]этил]амино]-5-карбоксипентил]амино]карбонил]окси]-7,12-дигидроксихолан-24-овой кислоты (1:3):



А) Метилловый эфир [3α(S),5β,7α,12α]-3-[[[6-(1,1-диметилэтоксид)-5-[бис[2-[бис(2-(1,1-диметилэтоксид)-2-оксоэтил]амино]этил]амино]-6-оксогексил]амино]карбонил]окси]-7,12-дигидроксихолан-24-овой кислоты

Способ 1: Раствор бис(трихлорметил)карбоната (2,9 г; 9,7 ммоль) в безводном CH₂Cl₂ (40 мл) добавляют по каплям в атмосфере азота к раствору метилового эфира (3α,5β,7α,12α)-3,7,12-тригидроксихолан-24-овой кислоты (коммерческий продукт) (10,0 г; 23,7 ммоль) и пиридина (2,3 мл; 28,4 ммоль) в безводном CH₂Cl₂ (100 мл), охлажденном до 0°C. Смесь оставляют нагреваться и через 1 час при комнатной температуре раствор охлаждают снова до 0°C, добавляют N,N-диизопропилэтиламин (7,9 мл; 47,3 ммоль), затем добавляют по каплям раствор (1,1-диметилэтилового) эфира N²,N²-бис[2-[бис[2-(1,1-диметилэтоксид)-2-оксоэтил]амино]

этил]-L-лизина (Anelli, P.L. et al Bioconjugate Chem. 1999, 10, 137) (17,6 г; 23,7 ммоль) в безводном CH_2Cl_2 (50 мл). Раствор перемешивают 3 часа при комнатной температуре, затем промывают H_2O (2×100 мл), сушат над Na_2SO_4 и выпаривают. Сырой продукт очищают с помощью флэш-хроматографии, получая нужный продукт (14,8 г; 12,4 ммоль).

Выход: 52%.

Спектры ^1H -ЯМР, ^{13}C -ЯМР, ИК и МС соответствуют указанной структуре.

Способ 2: Раствор метилового эфира [$3\alpha,5\beta,7\alpha,12\alpha$]-3-[(хлоркарбонил)окси]-7,12-дигидроксихолан-24-овой кислоты (Janout, V., Lanier, M.; Regen, S. L. J. Am. Chem. Soc. 1997, 119, 640) (6,1 г; 12,6 ммоль) в безводном CH_2Cl_2 (150 мл) охлаждают до 0°C в атмосфере азота и затем добавляют N,N-диизопропилэтиламин (4,8 мл; 27,6 ммоль). Затем добавляют по каплям раствор (1,1-диметилэтилового) эфира N^2, N^2 -бис[2-[бис[2-(1,1-диметилэтокси)-2-оксоэтил]амино]этил]-L-лизина (9,3 г; 12,6 ммоль) в безводном CH_2Cl_2 (20 мл). Раствор перемешивают 3 часа при комнатной температуре, затем промывают H_2O (2×100 мл), сушат над Na_2SO_4 и выпаривают. Сырой продукт очищают с помощью флэш-хроматографии, получая нужный продукт (11,9 г; 9,9 ммоль).

Выход: 79%.

Спектры ^1H -ЯМР, ^{13}C -ЯМР, ИК и МС соответствуют указанной структуре.

В) [$3\alpha(\text{S}),5\beta,7\alpha,12\alpha$]-3-[[[5-[Бис[2-[бис(карбоксиметил)амино]этил]амино]-5-карбоксипентил]амино]карбонил]окси]-7,12-дигидроксихолан-24-овая кислота

2 М Водный раствор LiOH (141 мл) добавляют по каплям к раствору соединения А) (11,2 г; 9,4 ммоль) в 1,4-диоксане (141 мл) при комнатной температуре. Через 104 часа раствор концентрируют (150 мл) и добавляют по каплям к 2 М водному раствору HCl (175 мл): конечное значение pH 1,9. Осадок отфильтровывают, промывают H_2O (5×50 мл) и сушат в вакууме. Сырой продукт очищают с помощью флэш-хроматографии.

Полученную твердую часть растворяют в 10% водн. CH_3CN и pH доводят до 1, добавляя концентрированную HCl, затем раствор вводят в колонку со смолой Amberlite® XAD 1600 (250 мл) и элюируют градиентом $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$.

Содержащие продукт фракции выпаривают, получая нужный продукт (4,3 г; 4,8 ммоль).

Выход: 51%. Т.пл.: $184-191^\circ\text{C}$

К.Ф.: 4,36%

$[\alpha]^{20}\text{D} = +19,5$ (с 1, 1 М NaOH)

ВЭЖХ анализ: 97,3 % (% площадь)

Неподвижная фаза: Nupurity Elite C 18 5 мкм; $250 \times 4,6$ мм колонка заполнена Nupersil

Температура: 40°C

Подвижная фаза: градиентное элюирование

A = 0,01 М KH_2PO_4 , 0,3 мМ EDTA в воде

B = CH_3CN

Градиент:

мин	%A	%B
0	95	5
20	65	35
50	65	35

Скорость потока: 1 мл/мин

Детектирование (УФ): 200 нм

Элементный анализ	C	H	N	Cl
% вычислено:	57,45	7,85	6,23	
% найдено:	55,22	7,91	6,08	<0,1

5

Спектры ^1H -ЯМР, ^{13}C -ЯМР, ИК и МС соответствуют указанной структуре.

С) Комплекс гадолиния с натриевой солью [3 α (S),5 β ,7 α ,12 α]-3-[[[5-[бис[2-бис(карбоксиметил)амино]этил]амино]-5-карбоксипентил]амино]карбонил]окси]-7,12-дигидроксихолан-24-овой кислоты (1:3)

10

Соединение, полученное на стадии В) (4,7 г; 5,2 ммоль), суспендируют в H_2O (100 мл) и растворяют, добавляя 1 М NaOH (10 мл) до pH 6,5. Добавляют раствор GdCl_3 (1,9 г; 5,2 ммоль) в H_2O (17 мл), поддерживая значение pH 6,5 добавлением 1 М NaOH (15,6 мл). Через 1 час при комнатной температуре раствор вводят в колонку со смолой Amberlite® XAD 16.00 (250 мл), элюируя градиентом $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$. Содержащие продукт фракции выпаривают, получая нужный продукт (4,2 г; 3,8 ммоль).

15

Выход 72%. Т. пл.: >300°C

К.Ф.: 9,49%

20

$[\alpha]^{20}\text{D} = + 2,63$ (С 2, H_2O)

ВЭЖХ анализ: 100 % (% площадь) (тот же способ, что на стадии В)

Элементный анализ	C	H	N	Gd	Na	Cl
% вычислено:	46,15	5,76	5,00	14,05	6,17	
% найдено:	41,80	6,28	4,54	12,64	5,73	<0,1

25

Спектры ^1H -ЯМР, ^{13}C -ЯМР, ИК и МС соответствуют указанной структуре.

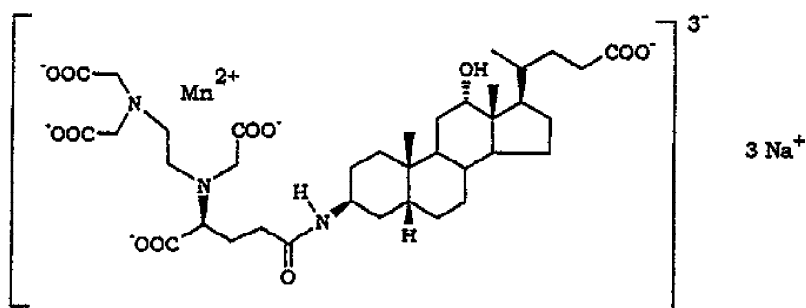
ПРИМЕР 14

30

Комплекс марганца с натриевой солью [3 β (S),5 β ,12 α]-3-[[4-[[2-бис(карбоксиметил)амино]этил](карбоксиметил)амино]-4-карбокси-1-оксобутил]амино]-12-гидроксихолан-24-овой кислоты (1:3):

35

40



А) Метилловый эфир [3 β (S),5 β ,12 α]-3-[[4-амино-5-метокси-1,5-диоксопентил]амино]-12-гидроксихолан-24-овой кислоты

45

3,4 г 5 % Pd/C добавляют к раствору метилового эфира [3 β (S),5 β ,12 α]-3-[[5-метокси-1,5-диоксо-4-[[[(фенилметокси)карбонил]амино]пентил]амино]-12-гидроксихолан-24-овой кислоты (пример 5, продукт В) (34,14 г; 50 ммоль) в MeOH (340 мл). Суспензию перемешивают при комнатной температуре более 3,5 часов в атмосфере водорода. После фильтрования через фильтр Millipore® FH (0,45 мкм) раствор выпаривают досуха, получая нужный продукт (27,1 г; 49,3 ммоль).

50

Выход: 98,6%

Потеря в весе (50°C; высокий вакуум): <0,1%

Элементный анализ	C	H	N
% вычислено:	67,85	9,55	5,10
% найдено:	68,58	9,72	5,12

5

$[\alpha]^{20}_D = + 36,61$ (с 2,01, CHCl_3)

Кислотный титр (0,1 М HCl): 94,6%

Спектры ^1H -ЯМР, ^{13}C -ЯМР, ИК и МС соответствуют указанной структуре.

10

В) Метилловый эфир $[3\beta(\text{S}),5\beta,12\alpha]$ -3-[[4-[[2-[бис[2-(1,1-диметилэтокси)-2-оксоэтил]амино]этил][2-(1,1-диметилэтокси)-2-оксоэтил]амино]-5-метокси-1,5-диоксопентил]амино]-12-гидроксиолан-24-овой кислоты

15

Соединение, полученное на стадии А) (16,0 г; 29,1 ммоль), и 1,1-диметилэтиловый эфир N -(2-бромэтил)- N -[2-(1,1-диметилэтокси)-2-оксоэтил]глицина (13,3 г; 37,8 ммоль) (полученный по способу, раскрытому в WO-A-95/32741: пример 15) растворяют в EtOAc (120 мл). После добавления 2 М фосфатного буфера pH 8 (120 мл) смесь интенсивно перемешивают в течение 2 часов, затем водную фазу заменяют свежим 2 М фосфатным буфером pH 8 (120 мл) и перемешивают еще 70 часов. Смесь нагревают до 40°C в течение 12 часов, охлаждают до комнатной температуры, разделяют и органическую фазу выпаривают, получая остаток, который растворяют в CH_2Cl_2 (150 мл), промывают водой (2×100 мл), сушат над Na_2SO_4 и выпаривают. Сырой продукт очищают с помощью флэш-хроматографии, получая нужный продукт (12,3 г; 15,0 ммоль).

25

Выход: 52%

Элементный анализ	C	H	N
% вычислено:	65,90	9,46	5,12
% найдено:	65,99	9,72	5,03

30

ТСХ: Неподвижная фаза: пластина силикагеля 60F 254 Merck

Элюент: 1:1= EtOAc /н-гексан $R_f = 0,40$

Детектирование: 1% KMnO_4 в 1 М NaOH

Спектры ^1H -ЯМР, ^{13}C -ЯМР, ИК и МС соответствуют указанной структуре.

35

С) Метилловый эфир $[3\beta(\text{S}),5\beta,12\alpha]$ -3-[[4-[[2-[бис[2-(1,1-диметилэтокси)-2-оксоэтил]амино]этил][2-(1,1-диметилэтокси)-2-оксоэтил]амино]-5-метокси-1,5-диоксопентил]амино]-12-гидроксиолан-24-овой кислоты

40

трет-Бутилбромацетат (3,9 г; 20,1 ммоль) добавляют по каплям к раствору соединения, полученного на стадии В) (11,0 г; 13,4 ммоль) и N,N -диизопропилэтиламина (3,5 мл; 20,1 ммоль) в CH_3CN . Смесь перемешивают при комнатной температуре 24 часа и затем добавляют еще N,N -диизопропилэтиламин (0,9 мл; 4,0 ммоль) и трет-бутилбромацетат (0,8 г; 4,0 ммоль). Смесь перемешивают еще 70 час, разделяют и органическую фазу выпаривают, получая остаток, который растворяют в CH_2Cl_2 (150 мл), промывают водой (2×100 мл), сушат над Na_2SO_4 и выпаривают. Сырой продукт очищают с помощью флэш-хроматографии, получая нужный продукт (10,7 г; 11,5 ммоль).

50

Выход: 85%.

Элементный анализ	C	H	N
% вычислено:	65,57	9,39	4,50
% найдено:	66,27	9,62	4,52

ТСХ: Неподвижная фаза: пластина силикагеля 60F 254 Merck

Элюент: 1:1= EtOAc/н-гексан $R_f=0,46$

Детектирование: 1% $KMnO_4$ в 1 М NaOH

Спектры 1H -ЯМР, ^{13}C -ЯМР, ИК и МС соответствуют указанной структуре.

D)[3 β (S),5 β ,12 α]-3-[[4-[[2-[Бис(карбоксиметил)амино]этил](карбоксиметил)амино]-4-карбоксо-1-оксобутил]амино]-12-гидроксихолан-24-овая кислота

2 М Водный раствор LiOH (120 мл) добавляют по каплям к раствору соединения, полученного на стадии С) (9,2 г; 9,8 ммоль) в 1,4-диоксане (120 мл) при комнатной температуре. Через 24 часа раствор концентрируют (100 мл) и добавляют по каплям к 2 М водной HCl (135 мл), конечное значение pH 1,9. Осадок отфильтровывают, промывают H_2O (5 \times 50 мл) и сушат в вакууме, получая нужный продукт (7,3 г; 9,6 ммоль).

Выход: 98% Т.пл.: 163-168 $^{\circ}C$

К.Ф.: 1,81%

$[\alpha]^{20}D = +29,03$ (с 1, 1 М NaOH)

ВЭЖХ анализ: 100% (площадь %)

Неподвижная фаза: Zorbax Eclipse XDB-C8 3,5 мкм; 150 \times 4,6 мм; колонка заполнена Rockland Technologies Inc.

Температура: 40 $^{\circ}C$

Подвижная фаза: градиентное элюирование

A = 0,01 М KH_2PO_4 , 0,01 М K_2HPO_4 0,3 мМ EDTA в воде

B = CH_3CN

Градиент:

мин	%A	%B
0	93	7
5	93	7
50	60	40

Скорость потока: 1 мл/мин

Детектирование (УФ): 200 нм

Элементный анализ	C	H	N	Li	Cl
% вычислено:	60,23	8,06	5,69		
% найдено:	58,60	8,25	5,49	<0,1	<0,1

Спектры 1H -ЯМР, ^{13}C -ЯМР, ИК и МС соответствуют указанной структуре.

E) Комплекс марганца с натриевой солью [3 β (S),5 β ,12 α]-3-[[4-[[2-[бис(карбоксиметил)амино]этил](карбоксиметил)амино]-4-карбоксо-1-оксобутил]амино]-12-гидроксихолан-24-овой кислоты (1:3)

Соединение, полученное на стадии D) (5,3 г; 7,2 ммоль), суспендируют в H_2O (250 мл) и растворяют, добавляя 1 М NaOH (36 мл) до pH 6,5. Добавляют раствор $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ (1,4 г; 7,2 ммоль) в H_2O (50 мл), поддерживая pH 6,5 добавлением 1 М NaOH (7,9 мл). Через 1 час при комнатной температуре раствор обессоливают, осуществляя наночелювльтрацию, затем выпаривают, получая нужный продукт.

Выход: 98% Т.пл.: >300 $^{\circ}C$

К.Ф.: 13,54%

$[\alpha]^{20}D = + 2,63$ (с 2, H_2O)

СЕ анализ: 100% (площадь %)

Капилляр: кварцевое стекло 0,72 м × 50 мкм

Напряжение: 30 кВ

Буфер: 0,07 М борат, рН 9,3, 0,3 мМ EDTA

Температура: 25°C

5

Время остановки: 20 мин

Детектирование (УФ): 200 нм

Инжекция: гидродинамическая (50 мбар, 4 сек)

Концентрация образца: 1 мг/мл

10

Прибор: Hewlett Packard 3D HPCE

Временная схема предварительной подготовки:

t (мин)	действие					
2	промывка H ₂ O					
15	2	промывка 0,1 М NaOH				
	1	промывка H ₂ O				
	5	промывка буфером				
Элементный анализ	C	H	N	Mn	Na	Cl
% вычислено:	51,87	6,35	4,90	6,41	8,05	
% найдено:	45,50	6,95	4,30	5,28	6,86	<0,1

20

Спектры ИК и МС соответствуют указанной структуре.

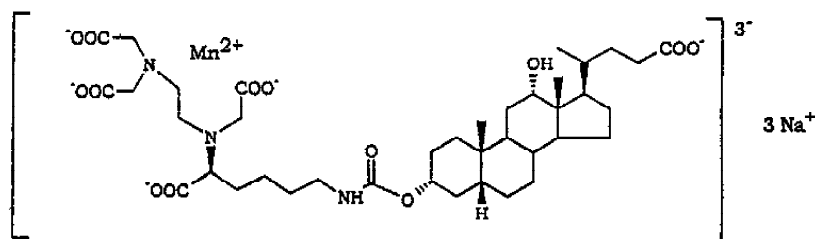
Тем же способом, исходя из соединения В) примера 2, получают гадолиниевый комплекс [3β(S),5β]-3-[[4-[[2-[[бис-(карбоксиметил)амино]этил](карбоксиметил)амино]-4-карбокси-1-оксобутил]амино]-12-оксохолан-24-овой кислоты.

25

ПРИМЕР 15

Комплекс марганца с натриевой солью [3α(S),5β,12α]-3-[[[5-[[2-[[бис(карбоксиметил)амино]этил](карбоксиметил)амино]-5-карбоксипентил]амино]карбонил]окси]-12-гидроксихолан-24-овой кислоты (1:3):

30



35

А) Метилловый эфир N²-[2-[[бис[2-(1,1-диметил-этокси)-2-оксоэтил]амино]этил]-N²-[2-(1,1-диметилэтокси)-2-оксоэтил]-N⁶-[(фенилметокси)карбонил]-L-лизина

40

1,1-диметилэтиловый эфир N-(2-бромэтил)-N-[2-(1,1-диметилэтокси)-2-оксоэтил] глицина (25,6 г; 72,55 ммоль) (полученный по способу, раскрытому в WO-A-95/32741: пример 15), растворенный в CH₃CN (25 мл), добавляют по каплям к раствору

45

гидрохлорида метилового эфира N⁶-[(фенилметокси)карбонил]-L-лизина (20 г; 60,46 ммоль) и N,N-диизопропилэтиламина (12,64 мл; 72,55 ммоль) в CH₃CN (250 мл).

Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре. Через 5 дней к раствору добавляют еще N,N-диизопропилэтиламин (17,7 мл; 101,6 ммоль) и трет-бутилбромацетат (18,8 г; 13,5 мл; 101,6 ммоль). Через 24 часа растворитель

50

выпаривают и остаток обрабатывают Et₂O (200 мл). Смесь фильтруют, раствор промывают 0,1 М HCl (2×100 мл), сушат над Na₂SO₄ и выпаривают при пониженном давлении. Сырой продукт очищают с помощью флэш-хроматографии, получая нужный продукт (13,03 г; 19,2 ммоль).

Выход: 32%.

К.Ф.: <0,1%

$[\alpha]^{20}_D = -22,47$ (с 1,93, CHCl_3)

5	Элементный анализ	С	Н	N
	% вычислено:	61,83	8,45	6,18
	% найдено:	61,70	8,52	5,84

ТСХ: Неподвижная фаза: пластина силикагеля 60F 254 Merck

10 Элюент: 3:7= EtOAc/н-гексан $R_f=0,40$

Детектирование: $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,18%) и $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (3,83%) в 10% H_2SO_4

Спектры ^1H -ЯМР, ^{13}C -ЯМР, ИК и МС соответствуют указанной структуре.

15 В) Метилловый эфир (3 α ,5 β ,7 α ,12 α)-3-[(хлоркарбонил)окси]-12-гидроксихолан-24-овой кислоты

Предостережение: все операции следует выполнять в хорошо вентилируемом вытяжном шкафу

20 20% Раствор фосгена в толуоле (100 мл; 202,2 ммоль) добавляют по каплям к раствору метилового эфира (3 α ,5 β ,7 α ,12 α)-3,12-дигидроксихолан-24-овой кислоты (14,7 г; 36 ммоль) в безводном CH_2Cl_2 (350 мл), охлажденном до 0°C в атмосфере азота. Раствор перемешивают 3 часа при комнатной температуре, затем выпаривают (ОСТОРОЖНО), получая нужный продукт (15,2 г; 32,4 ммоль).

Выход: 90%.

25 Спектры ^1H -ЯМР, ^{13}C -ЯМР, ИК и МС соответствуют указанной структуре.

С) Метилловый эфир [3 α (S),5 β ,12 α]-3-[[[5-[[2-[бис[2-(1,1-диметилэтокси)-2-оксоэтил]амино]этил][2-(1,1-диметилэтокси)-2-оксоэтил]амино]-6-метокси-6-оксогексил]амино]карбонил]окси]-12-гидроксихолан-24-овой кислоты

30 5% Pd/C (1,3 г) добавляют к раствору соединения, полученного на стадии А) (12,3 г; 18,1 ммоль), в MeOH (120 мл), и суспензию перемешивают в течение 3 часов в атмосфере водорода при комнатной температуре. После фильтрования через фильтр Millipore® (FT 0,45 мкм) раствор выпаривают при пониженном давлении. Сырой продукт растворяют в безводном CH_2Cl_2 (20 мл) и добавляют по каплям к 35 раствору соединения, полученного на стадии В) (8,7 г; 18,54 ммоль) и N,N-диизопропилэтиламина (DIEA) (6,5 мл; 37,07 ммоль) в безводном CH_2Cl_2 (200 мл) при 0°C и в атмосфере азота. Через 3 часа реакционную смесь промывают H_2O (2×100 мл), органическую фазу выделяют, сушат над Na_2SO_4 и выпаривают при пониженном давлении. Сырой продукт очищают с помощью флэш-хроматографии, получая 40 нужный продукт (8,6 г; 8,8 ммоль).

Выход: 49%.

К.Ф.: <0,1%

45	Элементный анализ	С	Н	N
	% вычислено:	65,07	9,38	4,30
	% найдено:	65,67	9,52	4,24

ТСХ: Неподвижная фаза: пластина силикагеля 60F 254 Merck

50 Элюент: 3:7= EtOAc/н-гексан $R_f=0,30$

Детектирование: $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,18%) и $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (3,83%) в 10% H_2SO_4

Спектры ^1H -ЯМР, ^{13}C -ЯМР, ИК и МС соответствуют указанной структуре.

D) [3 α (S),5 β ,12 α]-3-[[[5-[[2-[Бис(карбоксиметил)амино]этил](карбоксиметил)амино]-

5-карбокспентил]амино]карбонил]окси]-12-гидроксихолан-24-овая кислота

2 М LiOH (133 мл; 266 ммоль) добавляют к раствору соединения, полученного на стадии С) (8,5 г; 10,64 ммоль), в 1,4-диоксане (130 мл). Полученный раствор перемешивают при комнатной температуре 24 часа, а затем нейтрализуют до рН 7, добавляя 2 н HCl (120 мл). Раствор концентрируют, выпаривая при пониженном давлении до половины объема, и очень медленно подкисляют до рН 1,5 при интенсивном перемешивании, получая белый осадок, который отфильтровывают, промывают H₂O (2×100 мл) и сушат, получая нужный продукт (6,45 г; 8,13 ммоль).

Выход: 76%. Т.пл.: 188,9°С

К.Ф.: 1,44%

$[\alpha]^{20}_D = +35.47$ (с 2,01, 1 М NaOH)

ВЭЖХ анализ: 96,8% (площадь %)

Неподвижная фаза: Zorbax Eclipse XDB-C8 3,5мкм; 150×4,6 мм колонка
заполнена Rockland Technologies Inc.

Температура: 40°С

Подвижная фаза: градиентное элюирование

A = 0,017 М H₃PO₄ в воде

B = CH₃CN

Градиент:

мин	%A	%B
0	65	35
25	15	85
30	15	85

Скорость потока: 1 мл/мин

Детектирование (УФ): 210 нм

Элементный анализ	C	H	N	Li	Cl
% вычислено:	59,91	8,12	5,37		
% найдено:	58,44	8,04	5,03	<0,1	<0,1

Спектры ¹H-ЯМР, ¹³C-ЯМР, ИК и МС соответствуют указанной структуре.

Е) Комплекс марганца с натриевой солью [3α(S),5β,12α]-3-[[[5-[[2-бис(карбоксиметил)амино]этил](карбоксиметил)амино]-5-карбокспентил]амино]карбонил]окси]-12-гидроксихолан-24-овой кислоты (1:3)

Соединение, полученное на стадии D) (5 г; 6,3 ммоль), суспендируют в H₂O (50 мл) и растворяют, добавляя 1 М NaOH (18 мл; 18 ммоль). Добавляют 0,559 М водный раствор MnCl₂ (11,27 мл; 6,3 ммоль) более чем за 3 часа, поддерживая рН 6,5 посредством 1 М NaOH (7,8 мл). Доводят рН раствора до 6,8, добавляя 1 М NaOH (0,9 мл; 0,9 ммоль), фильтруют (НА мембрана 0,45 мкм Millipore®) и обессоливают наночистотой. Раствор выпаривают и сушат, получая нужный продукт (5,45 г; 6,05 ммоль).

Выход: 96% Т.пл.: >300°С

К.Ф.: 3,78%

$[\alpha]^{20}_D = +2,74$ (с 2, H₂O)

СЕ анализ: 100% (площадь %)

Капилляр: кварцевое стекло 0,72 м × 50 мкм

Напряжение: 30 кВ

Буфер: 0,07 М борат, рН 9,3, 0,3 мМ EDTA

Элементный анализ	C	H	N
% вычислено:	65,64	9,21	4,57
% найдено:	66,31	9,20	4,51

5 ТСХ: Неподвижная фаза: пластина силикагеля 60F 254 Merck
 Элюент: 2:8 = EtOAc/н-гексан $R_f = 0,3$
 Детектирование: AcOH/конц. H_2SO_4 /п-анисовый альдегид = 100:2:1
 Спектры 1H -ЯМР, ^{13}C -ЯМР, ИК и МС соответствуют указанной структуре.

10 В) Триэтиламмониевая соль $[3\beta(S), 5\beta, 7\alpha, 12\alpha]$ -3-[[4-[бис[2-[бис[2-(1,1-диметилэтокси)-2-оксоэтил]амино]этил]амино]-5-(1,1-диметилэтокси)-1,5-диоксопентил]амино]-7,12-дигидроксихолан-24-овой кислоты

15 5% Pd/C (3,6 г) добавляют к раствору соединения, полученного на стадии А) (36 г; 29,4 ммоль), в EtOH (1,5 л) и суспензию перемешивают в течение 3 часов в атмосфере водорода при комнатной температуре. После фильтрования (через фильтр Millipore® FT 0,45 мкм) раствор выпаривают при пониженном давлении. Сырой продукт очищают с помощью флэш-хроматографии, получая нужный продукт (22 г; 18 ммоль).

20 Выход 60%. Т.пл.: 58°C
 К.Ф.: 1,34%

Элементный анализ	C	H	N
% вычислено:	65,07	9,86	5,66
25 % найдено:	64,34	10,07	5,48

ТСХ: Неподвижная фаза: пластина силикагеля 60F 254 Merck

Элюент: 1:5:95 = Et₃N/MeOH/CH₂Cl₂ $R_f = 0,33$

Детектирование: AcOH/конц. H_2SO_4 /п-анисовый альдегид = 100:2:1

30 Спектры 1H -ЯМР, ^{13}C -ЯМР, ИК и МС соответствуют указанной структуре.

С) N²-Бис[2-[бис(карбоксиметил)амино]этил]-N-[(3β,5β,7α,12α)-7,12-дигидрокси-24-оксо-24-[(2-сульфоэтил)амино]холан-3-ил]-L-глутамин

35 Et₃N (1,2 г; 12 ммоль; 1,7 мл) добавляют по каплям к раствору соединения В) (12,5 г; 11 ммоль), 2-аминоэтансульфоновой кислоты (коммерческий продукт) (1,5 г; 12 ммоль) и диэтилцианофосфоната (коммерческий продукт) (2,1 г; 12 ммоль; 2 мл) в ДМФ (400 мл) при 0°C и в атмосфере азота. Через 20 минут реакционную смесь оставляют нагреваться до комнатной температуры и перемешивают 3 часа. Раствор выпаривают при пониженном давлении, остаток растворяют в диоксане (250 мл) и по каплям добавляют 0,5 М водную H_2SO_4 (250 мл; 125 ммоль). Полученную смесь нагревают при 90°C в течение 2 часов. Доводят pH раствора с 1,4 до 7, добавляя
 40 2 н. NaOH, и растворитель выпаривают при пониженном давлении. Сырой продукт очищают с помощью флэш-хроматографии. Продукт растворяют в H₂O (250 мл) и 2
 45 н. HCl (12,5 мл) и обессоливают, элюируя градиентом CH₃CN/H₂O через колонку со смолой Amberlite® XAD-16.00, получая нужный продукт (1,5 г; 1,6 ммоль).

Выход 14%. Т.пл.: >200°C

К.Ф.: 5,87%

Элементный анализ	C	H	N	S
% вычислено:	53,68	7,44	7,28	3,33
50 % найдено:	50,34	7,71	6,64	2,99

Спектры ^1H -ЯМР, ^{13}C -ЯМР, ИК и МС соответствуют указанной структуре.

D) Комплекс гадолиния с натриевой солью N^2 -бис[2-[бис(карбоксиметил)амино]этил]-N-[(3 β ,5 β ,7 α ,12 α)-7,12-дигидрокси-24-оксо-24-[(2-сульфоэтил)амино]холан-3-ил]-L-глутамин (1:3)

Продукт C) (880 мг; 0,915 ммоль) растворяют в H_2O (50 мл) и 1 н. NaOH добавляют по каплям до достижения значения pH 6,8. Добавляют Gd_2O_3 (165 мг; 0,46 ммоль) и полученную суспензию нагревают при 50°C в течение 6 часов. Реакционную смесь отфильтровывают через аппарат Millipore® (НА фильтр 0,45 мкм) и полученный фильтрат вводят в колонку со слабой катионно-обменной смолой Dowex® CCR 3LB (Na^+ форма, 20 мл). Элюат выпаривают при пониженном давлении и сушат, получая нужный продукт (1,00 г; 0,75 ммоль).

Выход 82%. Т.пл.: $>250^\circ\text{C}$

К.Ф.: 13,95%

ВЭЖХ анализ: 100% (площадь %)

Неподвижная фаза: Lichrospher 100 RP-8 5 мкм; 250×4 мм колонка заполнена Merck KGaA

Температура: 40°C

Подвижная фаза: изократическое элюирование предварительно смешанной подвижной фазой: 1 г н-октиламина добавляют к 300 мл ацетонитрила в смеси с 700 мл воды. Раствор буферизируют до pH 6, добавляя H_3PO_4

Скорость потока: 1 мл/мин

Детектирование (УФ): 200 нм

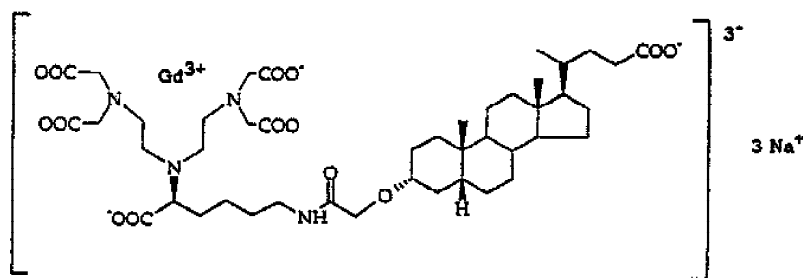
Элементный анализ	C	H	N	S	Gd	Na
% вычислено:	43,78	5,54	5,92	2,71	13,30	5,83
% найдено:	36,82	6,04	5,11	2,18	10,64	5,35

Спектры ИК и МС соответствуют указанной структуре.

Аналогичным способом получают гадолиниевый комплекс N^2 -бис[2-[бис(карбоксиметил)амино]этил]-N-[(3 β ,5 β)-24-оксо-24-[(2-сульфоэтил)амино]холан-3-ил]-L-глутамин.

ПРИМЕР 17

Комплекс гадолиния с натриевой солью [3 α (S),5 β]-3-[2-[[5-[бис[2-[бис(карбоксиметил)амино]этил]амино]-5-карбоксипентил]амино]-2-оксоэтокси]холан-24-овой кислоты (1:3):



A) Метилловый эфир [3 α ,5 β]-3-(карбоксиметокси)холан-24-овой кислоты

Трифлат бензилгликолята (Williams, M. A.; Rapoport, H. J. Org. Chem. 1994, 59, 3616) (16,8 г; 56,3 ммоль) добавляют за промежуток времени более 15 минут к перемешиваемому раствору метилового эфира [3 α ,5 β]-3-гидроксихолан-24-овой кислоты (Dayal, V. et al. Steroids 1981, 37, 239) (20 г; 51,2 ммоль) и N,N-

диизопропилэтиламина (10 мл; 57,4 ммоль) в безводном CH_3CN (400 мл) при -20°C . Через 4 часа при -20°C смесь нагревают до комнатной температуры и перемешивают еще 4 часа. Растворитель выпаривают, а остаток распределяют между EtOAc (300 мл) и насыщенным NaHCO_3 (300 мл). Органическую фазу сушат над Na_2SO_4 и выпаривают. Остаток растворяют в EtOH (200 мл), затем добавляют 5% Pd/C (3 г) и смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 5 часов в атмосфере водорода. После фильтрования через фильтр Millipore® FH (0,45 мкм) раствор выпаривают, а остаток очищают с помощью флэш-хроматографии, получая нужный продукт (14,2 г; 31,7 ммоль).

Выход: 62%

К.Ф.: <0,1

Элементный анализ	C	H
% вычислено:	72,28	9,89
% найдено:	71,97	9,81

Спектры ^1H -ЯМР, ^{13}C -ЯМР, ИК и МС соответствуют указанной структуре.

В) $[3\alpha(\text{S}),5\beta]$ -3-[2-[[5-[бис[2-[бис(карбоксиметил)амино]этил]амино]-5-карбоксопентил]амино]-2-оксоэтокси]холан-24-овая кислота

(1,1-Диметилэтиловый) эфир N^2,N^2 -бис[2-[бис[2-(1,1-диметилэтокси)-2-оксоэтил]амино]этил]-L-лизина (Anelli, P. L. et al. *Bioconjugate Chem.* 1999, 10, 137) (18,56 г; 25 ммоль), соединение А) (11,2 г; 25 ммоль) и диэтилцианофосфонат (коммерческий продукт) (4,9 г; 28 ммоль) растворяют в ДМФ (300 мл). Полученный раствор охлаждают до 0°C и по каплям добавляют Et_3N (4 мл). Через 6 часов при комнатной температуре раствор выпаривают при пониженном давлении, остаток растворяют в EtOAc (250 мл), промывают 5% водным NaHCO_3 (2×100 мл) и затем рассолом (2×100 мл). Органическую фазу выделяют, сушат над Na_2SO_4 и затем выпаривают при пониженном давлении. Остаток растворяют в диоксане (300 мл) и по каплям добавляют 0,5 М водную H_2SO_4 (300 мл; 150 ммоль). Полученную смесь нагревают при 90°C в течение 2 часов. Доводят pH раствора до 7, добавляя 2 н. NaOH , и растворитель выпаривают при пониженном давлении. Сырой продукт очищают с помощью флэш-хроматографии. Продукт растворяют в H_2O (300 мл) и 2 н. HCl (30 мл) и обессоливают, элюируя через колонку со смолой Amberlite® XAD-16.00 градиентом $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$, с получением нужного продукта (9,03 г; 10,25 ммоль).

Выход 41%.

К.Ф.: 2,78%

Элементный анализ	C	H	N
% вычислено:	59,98	8,24	6,36
% найдено:	58,11	8,28	6,14

Спектры ^1H -ЯМР, ^{13}C -ЯМР, ИК и МС соответствуют указанной структуре.

С) Комплекс гадолиния с натриевой солью $[3\alpha(\text{S}),5\beta]$ -3-[2-[[5-[бис[2-[бис(карбоксиметил)амино]этил]амино]-5-карбоксопентил]амино]-2-оксоэтокси]холан-24-овой кислоты (1:3)

Продукт В) (5 г; 5,67 ммоль) растворяют в H_2O (200 мл), добавляя 1 н. NaOH до достижения pH 6,8. Добавляют Gd_2O_3 (1,03 г; 2,84 ммоль) и полученную суспензию нагревают при 50°C в течение 8 часов. Реакционную смесь фильтруют через аппарат Millipore® (HA 0,45 мкм фильтр) и фильтрат выпаривают при пониженном

давления, сушат, получая нужный продукт (5,74 г; 5,21 ммоль).

Выход 92%. Т.пл.: >250°C

К.Ф.: 5,81%

5	Элементный анализ	C	H	N	Gd	Na
	% вычислено:	47,99	6,04	5,09	14,28	6,26
	% найдено:	45,09	6,15	4,77	13,39	5,81

Спектры ИК и МС соответствуют указанной структуре.

10 Аналогичным образом, исходя из соединения А) примера 15, получают гадолиниевый комплекс [3 α (S),5 β]-3-[2-[[5-[[2-[бис(карбоксиметил)амино]этил](карбоксиметил)амино]-5-карбокспентил]амино]-2-оксоэтокси]холан-24-овой кислоты

15 Аналогичным образом, исходя из соединения А) примера 15 и метилового эфира (3 β ,5 β ,7 α ,12 α)-3-[(3-карбоксо-1-оксопропил)амино]-7,12-дигидроксихолан-24-овой кислоты (полученного по способу, раскрытому в WO-A-95/32741: пример 12), получают гадолиниевый комплекс [3 β (S),5 β ,7 α ,12 α]-3-[[4-[[5-[[2-
20 [бис(карбоксиметил)амино]этил](карбоксиметил)амино]-5-карбокспентил]амино]-1,4-диоксобутил]амино]-7,12-дигидроксихолан-24-овой кислоты.

ПРИМЕР 18

Измерения скорости релаксации ($\Delta 1/T_1$)

25 Эффективность соединений настоящего изобретения в качестве агентов для кровяного депо оценивают путем построения графиков скорости релаксации $1/T_1$ в зависимости от времени, прошедшего после введения. Скорость релаксации протонов $1/T_1$ образцов крови, полученных в заранее определенные моменты времени, измеряют при температуре 39°C на приборе Brucker Minispec PC120, используя трехпараметрические последовательности «inversion recovery».

30 Соединение, полученное в примере 1, комплекс гадолиния с 1-деокси-1-(метиламино)-D-глицитоловой солью [3 β (S),5 β]-3-[[4-[бис[2-[бис(карбоксиметил)амино]этил]амино]-4-карбоксо-1-оксобутил]амино]холан-24-овой кислоты (1:3) вводят кроликам в дозе 0,1 ммоль/кг. На диаграмме (Фиг. 1) представлен график скорости релаксации.

35 Соединение, полученное в примере 9 патентной заявки WO 95/32741, комплекс гадолиния с 1-деокси-1-(метиламино)-D-глицитоловой солью [3 β ,5 β ,7 α ,12 α]-3-[[N-[N-[2-[[2-[бис(карбоксиметил)амино]этил](карбоксиметил)амино]этил]-N-(карбоксиметил)глицил]глицил]амино]-7,12-дигидроксихолан-24-овой кислоты (1:2) вводят кролику в дозе 0,1 ммоль/кг. На диаграмме (Фиг.2) представлен график скорости релаксации.

45 Соединение, полученное в примере 15 патентной заявки WO 95/32741, комплекс гадолиния с 1-деокси-1-(метиламино)-D-глицитоловой солью [3 β (S),5 β ,7 α ,12 α]-3-[[4-[бис[2-[бис(карбоксиметил)амино]этил]амино]-4-карбоксо-1-оксобутил]амино]-7,12-дигидроксихолан-24-овой кислоты (1:3), вводят кролику в дозе 0,1 ммоль/кг. На диаграмме (Фиг.3) представлен график скорости релаксации.

50 Соединение, полученное в примере 4, комплекс гадолиния с 1-деокси-1-(метиламино)-D-глицитоловой солью [3 β (S),5 β ,12 α]-3-[[4-[бис[2-[бис(карбоксиметил)амино]этил]амино]-4-карбоксо-1-оксобутил]амино]-12-гидроксихолан-24-овой кислоты (1:3) вводят обезьяне в дозе 0,05 ммоль/кг. На диаграмме (Фиг.4) представлен график скорости релаксации.

ПРИМЕР 19

0,3 М Фармацевтическая композиция комплекса гадолиния с 1-деокси-1-(метиламино)-D-глицитоловой солью [3β(S),5β,12α]-3-[[4-[бис[2-бис(карбоксиметил)амино]этил]амино]-4-карбокси-1-оксобутил]амино]-12-гидроксиолан-24-овой кислоты (1:3)

31,775 кг Комплекса гадолиния с 1-деокси-1-(метиламино)-D-глицитоловой солью [3β(S),5β,12α]-3-[[4-[бис[2-бис(карбоксиметил)амино]этил]амино]-4-карбокси-1-оксобутил]амино]-12-гидроксиолан-24-овой кислоты (1:3) (полученной по способу примера 4) и 100 г трометамолгидрохлорида растворяют в 100 л стерильной воды при комнатной температуре в фармацевтическом реакторе из нержавеющей стали. После растворения pH раствора доводят до 7,4, добавляя 1 М трометамол. Раствор фильтруют в стерильных условиях через фильтры диаметром 0,22 мм и распределяют в 20 мл ампулы, которые закрывают галогенобутиловыми пробками, герметизируют алюминиевыми кольцами и стерилизуют паром при Fo=18. ВЭЖХ показывает 0,294 М титр.

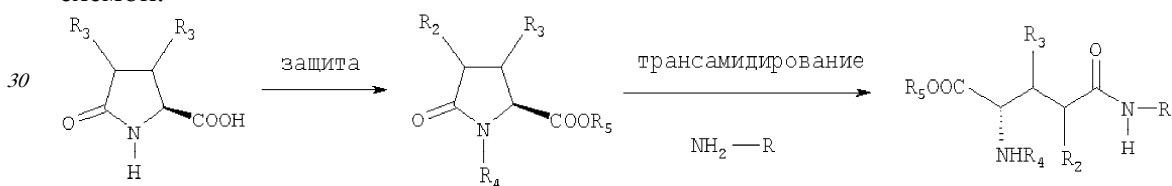
ПРИМЕР 20

Предварительно заполненные пластиковые шприцы, содержащие композицию примера 19.

Порции по 20 мл раствора, приготовленного в примере 19, помещают в CZ пластиковый шприц, кончик которого закрыт наконечником. Поршень вставляют под вакуумом и предварительно заполненный шприц стерилизуют в автоклаве до величины Fo=18.

Формула изобретения

Способ получения γ-амидов глутамовой кислоты в соответствии со следующей схемой:



где:

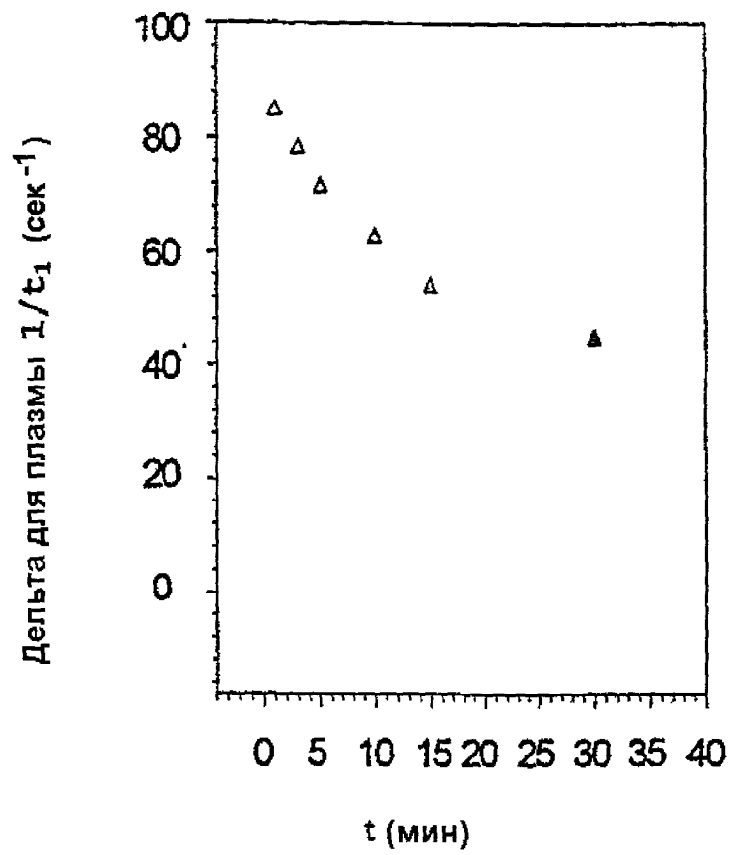
R₄ представляет аминозащитную группу, выбранную из карбобензилоксигруппы (CBz),

R₅ представляет неразветвленный или разветвленный C₁-C₁₀алкил,

R₂ и R₃ независимо представляют атом водорода,

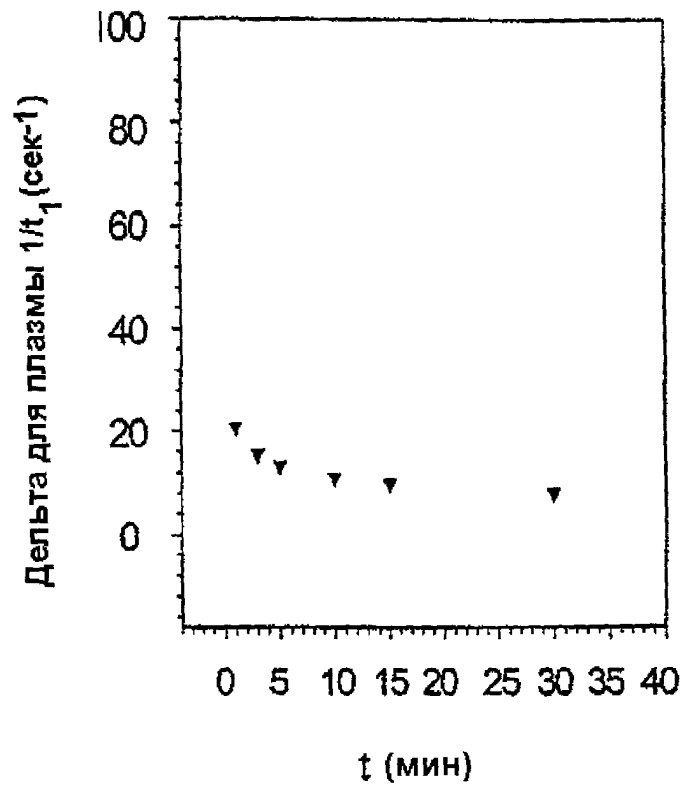
R-NH₂ представляет собой 3-аминопроизводное желчной кислоты.

Плазма кролика



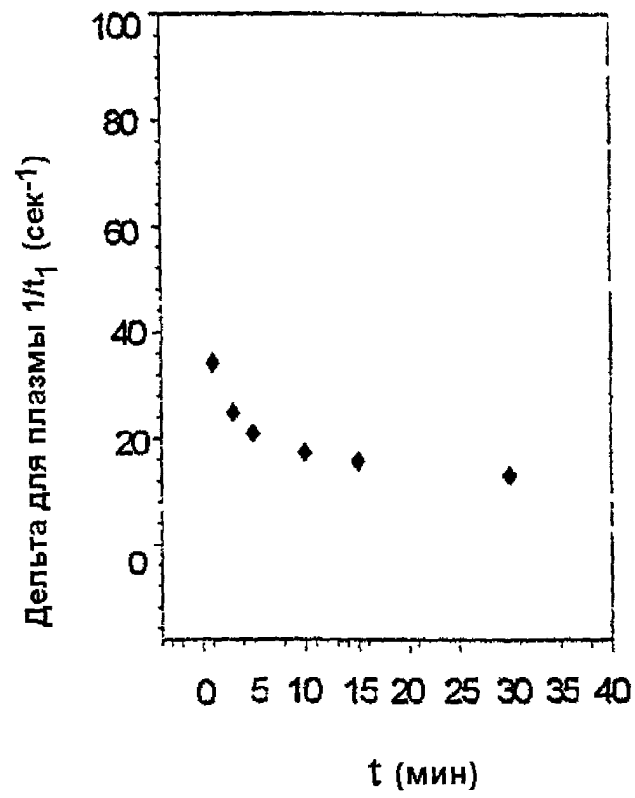
ФИГ. 1

Плазма кролика



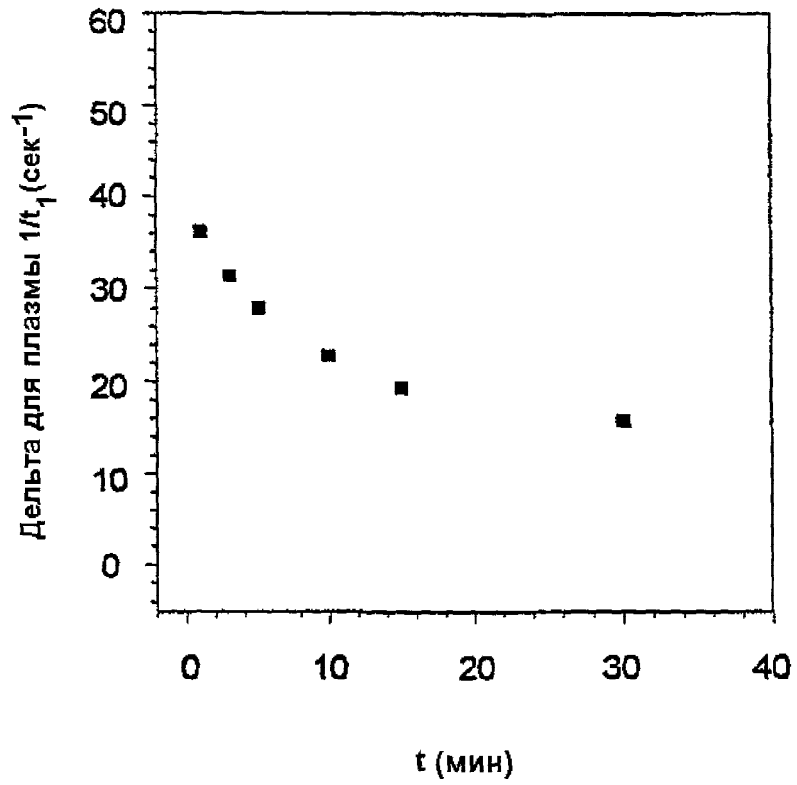
ФИГ. 2

Плазма кролика



ФИГ. 3

Плазма обезьяны



ФИГ. 4