(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2005-507005
(P2005-507005A)
(43)公表日　平成17年3月10日(2005.3.10)

(51)Int.Cl.[7]	F I			テーマコード（参考）
C07F 9/6524	C07F	9/6524		4C061
A61B 1/00	A61B	1/00	300D	4C085
A61K 49/00	A61K	49/00	A	4H048
C07F 5/00	C07F	5/00	D	4H050

審査請求 未請求　予備審査請求 有　（全 70 頁）

(21)出願番号　特願2003-538170(P2003-538170)
(86)(22)出願日　平成14年10月22日(2002.10.22)
(85)翻訳文提出日　平成16年4月22日(2004.4.22)
(86)国際出願番号　PCT/US2002/034242
(87)国際公開番号　WO2003/035655
(87)国際公開日　平成15年5月1日(2003.5.1)
(31)優先権主張番号　60/355,684
(32)優先日　平成13年10月22日(2001.10.22)
(33)優先権主張国　米国(US)

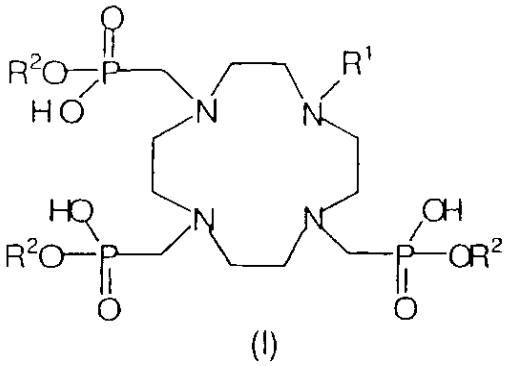
(71)出願人　500480012
テキサス　テック　ユニバーシティー
アメリカ合衆国　テキサス州　ラブボック　ピー．オー．　ボックス　４２００７
テキサス　テック　ユニバーシティー　ヘルス　サイエンシズ　センター
(71)出願人　502141050
ダウ　グローバル　テクノロジーズ　インコーポレイティド
アメリカ合衆国，ミシガン　４８６７４，ミッドランド，ワシントン　ストリート，１７９０　ビルディング
(74)代理人　100099759
弁理士　青木　篤

最終頁に続く

(54)【発明の名称】組織特異的蛍光キレート

(57)【要約】
インビトロ又はインビボ診断用薬中で蛍光剤として使用できる、テトラアザ大環状化合物と組合わさったランタニド、テルビウム、ユウロピウム及びジスプロシウムの蛍光キレートが記載される。これらのキレートは、軟組織癌に対して組織特異的な造影剤である。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
式：
【化１】

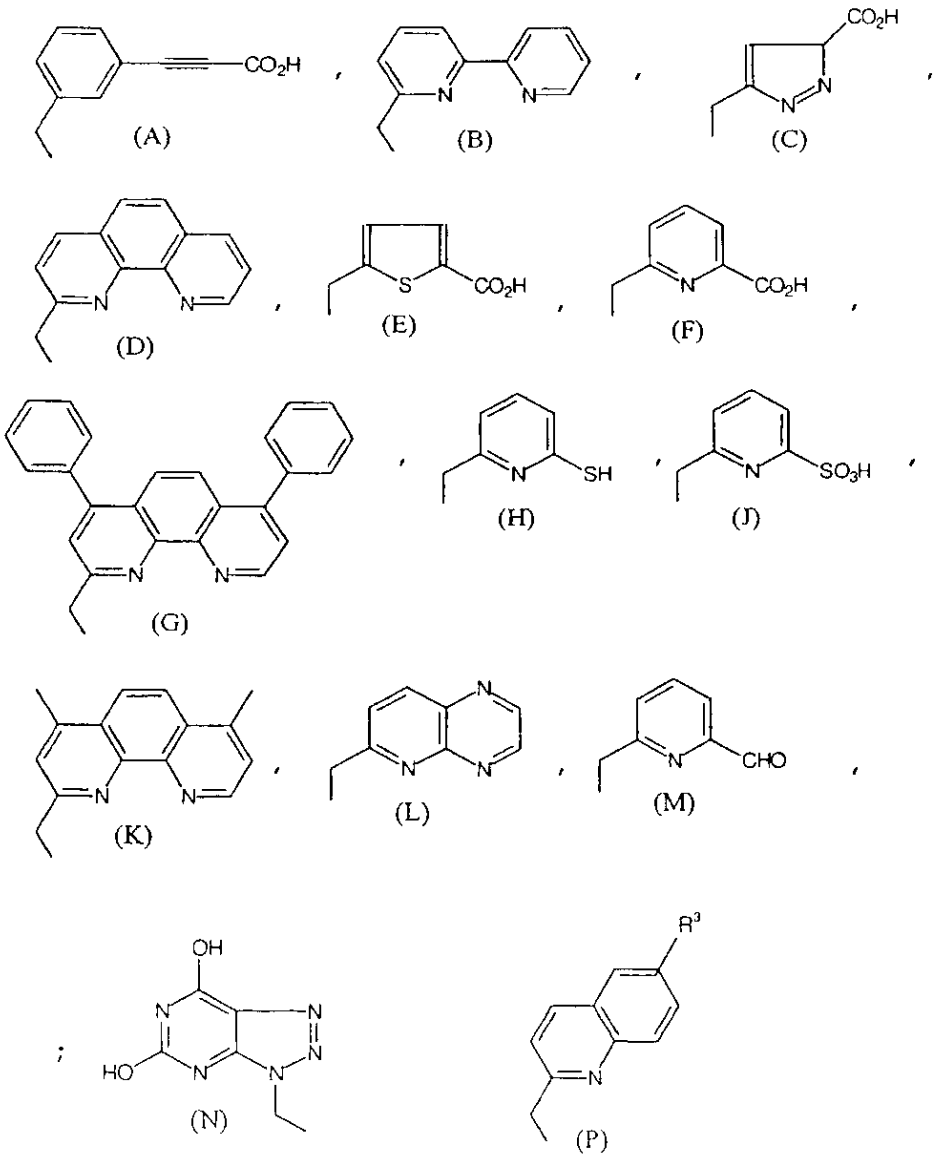


(I)

（式中、Ｒ[1]は

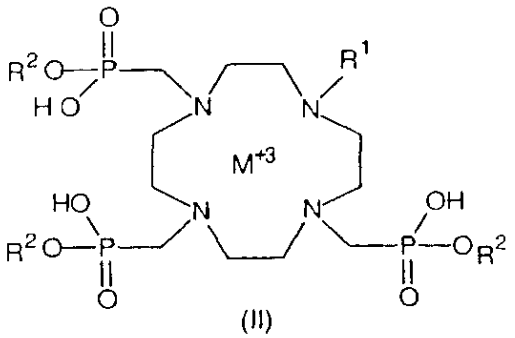
10

【化２】



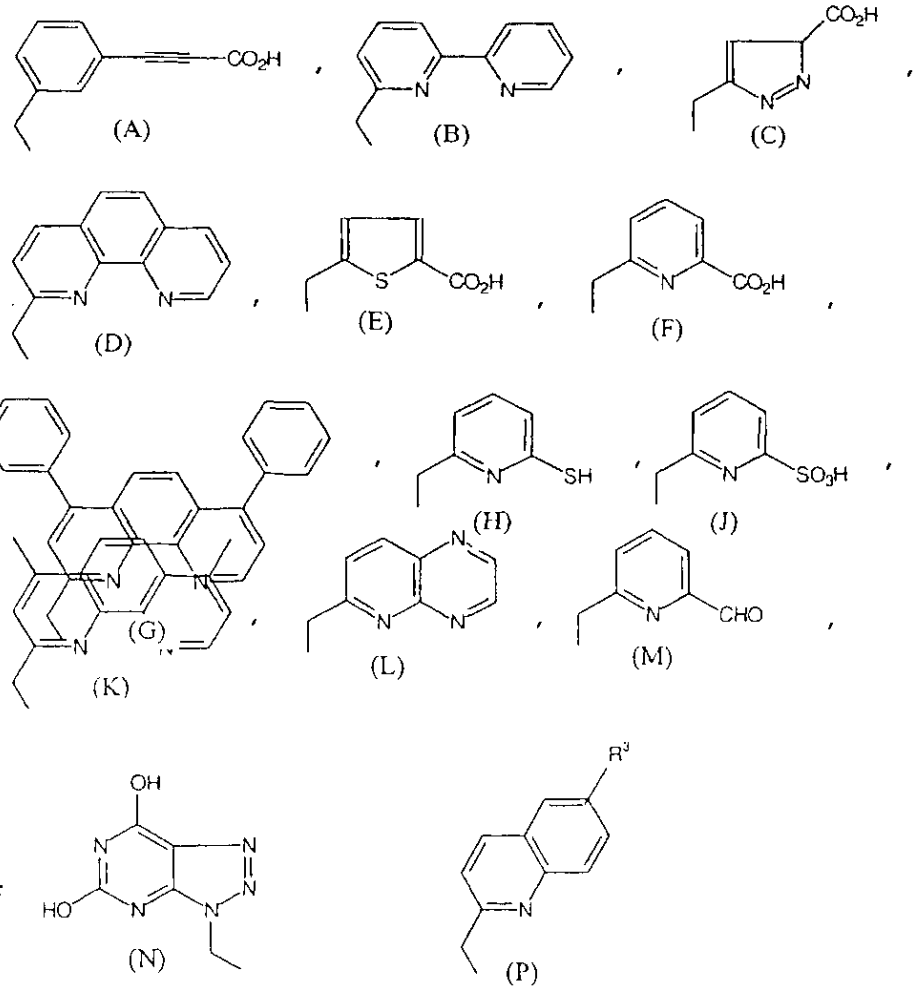
であり；
R^2はメチル、エチル、プロピル、ブチル又はＨであり；
R^3はＦ、C_1～C_4アルキル、Ｏ（C_1～C_4アルキル）又はＣｌである）
のテトラアザ大環状化合物又はそれらの医薬的に許容し得る塩。
【請求項２】
式：

【化３】



(II)

（式中、Ｒ[1]は、
【化４】



(A) (B) (C) (D) (E) (F) (G) (H) (J) (K) (L) (M) (N) (P)

であり；
Ｒ[2]はメチル、エチル、プロピル、ブチル又はＨであり；
Ｒ[3]はＦ、Ｃ[1]～Ｃ[4]アルキル、Ｏ（Ｃ[1]～Ｃ[4]アルキル）又はＣｌであり；
Ｍは、テルビウム（Ｔｂ）、ユウロピウム（Ｅｕ）、ランタニド（Ｌａ）又はジスプロシウム（Ｄｙ）の金属イオンである）

のテトラアザ大環状キレート化合物又はそれらの医薬的に許容し得る塩。
【請求項３】
テルビウム１－［２－（６－メトキシ）メチレンキノリニル］－４，７，１０－トリ（メチレンホスホン酸）－１，４，７，１０－テトラアザシクロドデカン。
【請求項４】
ユウロピウム１－［２－（６－メトキシ）メチレンキノリニル］－４，７，１０－トリ（メチレンホスホン酸）－１，４，７，１０－テトラアザシクロドデカン。
【請求項５】
ユウロピウム１－［２－（６－クロロ）メチレンキノリニル］－４，７，１０－トリ（メチレンホスホン酸）－１，４，７，１０－テトラアザシクロドデカン。
【請求項６】
テルビウム１－［２－（６－クロロ）メチレンキノリニル］－４，７，１０－トリ（メチレンホスホン酸）－１，４，７，１０－テトラアザシクロドデカン。
【請求項７】
ユウロピウム１－［２－（６－フルオロ）メチレンキノリニル］－４，７，１０－トリ（メチレンホスホン酸）－１，４，７，１０－テトラアザシクロドデカン。
【請求項８】
テルビウム１－［２－（６－フルオロ）メチレンキノリニル］－４，７，１０－トリ（メチレンホスホン酸）－１，４，７，１０－テトラアザシクロドデカン。
【請求項９】
請求項１の化合物を医薬的に許容し得る担体と共に含んでなる医薬製剤。
【請求項１０】
投与用の液剤中のキレート剤の量が０．１～５ｍＭである請求項９に記載の製剤。
【請求項１１】
有効量の請求項９の製剤を動物に投与し、画像を得ることを含んでなる動物の疾患状態の診断方法。
【請求項１２】
製剤化されたキレートを注射液剤又は洗浄液として投与する請求項１１に記載の方法。
【請求項１３】
局所投与するキレートの投与量が０．１～５ｍＭの溶液の形態である請求項１１に記載の方法。
【請求項１４】
有効量の請求項９の製剤を動物に投与して、画像を得ることを含んでなる動物の画像化方法。
【請求項１５】
内視鏡的螢光イメージングマイクロスコープを用いて前記画像を得る請求項１２に記載の方法。
【請求項１６】
紫外線光源を用いて前記画像を得る請求項１４又は１５に記載の方法。
【請求項１７】
インビボで画像化された組織において、製剤中の請求項１に記載の錯体を定量する請求項１３又は１４に記載の方法。
【請求項１８】
疾病の状態が口腔癌又は食道癌である請求項１１に記載の方法。
【請求項１９】
媒体上にサンプルを配置し、有効量の請求項１の化合物を添加し、その後に結果を読み取ることを含んでなる組織サンプルのインビトロ・イムノアッセイ又はＤＮＡハイブリッド形成の方法。
【請求項２０】
化合物を水溶液中の金属イオンハロゲン化物と反応させることを含んでなる請求項２に記

載された式（ＩＩ）の錯体の調製方法。
【請求項２１】
疾病の状態に関して請求項２のキレートの検出に使用する紫外線波長が３００～３４０ｎｍである請求項１１に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、可視コントラスト増強剤又は診断用薬として使用できる、目視可能な組織特異的ランタニド、テルビウム、ユウロピウム又はジスプロシウムキレートに関する。
【背景技術】
【０００２】
多数の化学的及び生物医学的分析方式の中核をなすのは、螢光イメージングであることがわかっている。これらの方式の多くは、螢光種をマーカー、ステイン（染色液）、染料又は指示薬として導入することに基づく（非特許文献１～３）。
【０００３】
ランタニドイオンに由来する有機キレートは、時間分割螢光定量アッセイ用の感度の良い螢光マーカーとしてますます重要性を増してきている（非特許文献４～７参照）、特に、テルビウム及びユウロピウム錯体は、可視領域に有効な螢光発光があるため、これらの用途に特筆すべき価値がある（特許文献１）。これらのイオンはいずれも、錯体を形成していない形態では螢光発光が弱いが、適当な有機配位子でキレート化すると、この可視発光は劇的に増大する。従って、有機配位子は紫外線を吸収するためのアンテナとして作用すると共に、また、このエネルギーを金属イオンに移動させる役割をし、金属イオンは次に吸収エネルギーを可視光の形態で分散させる。この現象のメカニズムの詳細はよく研究されており、広く文献に記載されている（非特許文献８）。
【０００４】
長寿命の螢光が可能なキレートは多数あるが、これらの錯体が全て生物学的用途に適するわけではない。その理由の１つは、水性媒体中においてそれらが不安定なことにある（非特許文献９）。実際には、大多数の螢光キレートは、非水性条件においてのみ作用する。これは主として、錯体が水溶液中で不安定であることによる、錯体を形成しない金属の存在と、可視光発光を引き起こす螢光経路の消光のためである。最終的には、この型の錯体は低濃度では感度の良いマーカーではなく、軟組織への金属付着のためにインビボでは毒性の問題を生じる。
【０００５】
近年、テトラアザ大環状中心をベースとするキレート化剤が、水性安定ランタニドキレートの生成に極めて有用であることがわかってきた。特に、１，４，７，１０－テトラアザシクロドデカンに由来するアミノカルボキシレート及びアミノホスホネートキレート化剤が安定性の高いランタニドキレートであることが示されている（非特許文献１０、特許文献２）。この種のキレートはその優れた性質のため、磁気共鳴映像法及び骨髄剥離のような診断及び治療医療に有用である。更に、ピリジン核のような芳香族部分を取り込んでいる、これらの大環状キレート化剤のいくつかの型は、テルビウム及びユウロピウムと一緒になって非常に有効な螢光性を示した（特許文献３）。この特許において、Ｋａｎｋａｒｅらは、ピリジン核を含む１４員大環状ユウロピウムキレートがヒトＩｇＧと複合体を形成できることを示した。従って、得られる複合体は、螢光イムノアッセイ法によって定量できる感度の高い螢光標識（キレート）を含む。
【０００６】
ガドリニウム（Ｇｄ）に基づく常磁性大環状キレートを磁気共鳴映像法用の造影剤として使用することは、かなり注目されている。ランタニドキレートの魅力はまさに、人体中で見られる難しい水性環境下においてそれらが動的及び熱力学的に安定であることによるものである。テルビウム（Ｔｂ）及びユウロピウム（Ｅｕ）のようなランタニドが中核にある場合には、強い螢光を引き起こすであろう適当な修飾を、この型の配位子に行うことが

できる。非特許文献１１は、大環状ピリジン含有配位子に基づくいくつかの潜在的ＭＲＩ造影剤に関する最近の研究を報告している。この研究において、内圏水配位は、テルビウム及びユウロピウムキレートの螢光性を測定するによって調べられた。

【０００７】

医療用の大環状ランタニドキレートの重要性は、組織特異的薬剤の開発と共に増大し続けている。これまでは、治療及び診断用の放射性及び常磁性金属イオンのキレート化に用途の重点が置かれていた（特許文献２；ＭＲＩ用のガドリニウムキレートの例はＳｑｕｉｂ製のＰｒｏｈａｎｃｅ（商標）及びＧｕｅｒｂｅｔ製のＤｏｔａｒｅｍ（商標）である）。しかし、これらのキレートは螢光性を有さない。

【０００８】

目視可能な組織特異的薬剤としての螢光キレートの使用は特許文献４において検討されている。これらは、紫外線照射時に結腸癌の目視検出に使用できる、比較的短い２６０～２８０ｎｍの波長の紫外線での励起時に螢光を発する大環状ランタニドキレートである。

【０００９】

毎年約３１，０００人のアメリカ人が口腔癌になっている（男性では全癌の４％、女性では２％）（非特許文献１２）。これらの癌患者の約半分は診断から５年以内に死亡し、生存者の多くは、外観が損なわれ且つ／又は機能的妥協をする。従って、早期診断は、生存率を５０％から８０％に増加できることもあるので、重要である（非特許文献１３）。食道及び上部気道消化管（ｕｐｐｅｒ　ａｅｒｏｄｉｇｅｓｔｉｖｅ　ｔｒａｃｔ）における第２の原発癌の発生率は２～３０％であると推定されている（非特許文献１４～１６）。これらの第２の原発腫瘍を早期段階で検出することは有利であろう。

【００１０】

口腔癌の早期検出に現在最も広く使用されている非侵襲的方法は、白色光照明下における全体的総視覚化（ｇｒｏｓｓ　ｖｉｓｕａｌｉｚａｔｉｏｎ）である。この方法は、異常組織に関する視覚的コントラストが低いため、悪性でない病変と区別するのが非常に難しい形成異常及び前癌状態の病変の早期検出には特に問題がある可能性がある。早期検出の改善を試みるための分光法が開発されている。正常組織と病変組織との分光コントラストを増大させるためには造影剤が使用される。ほとんどの造影剤は、全身投与が有効でなければならないが、全身投与は組織を光毒性に暴露する。これらの造影剤は非侵襲的に投与するのが好ましいであろう。

【００１１】

これまで、螢光キレートの商業的用途は主に、イムノアッセイのためのタンパク質及び抗体の標識化に限定されてきた（非特許文献１７、特許文献５）。ＦＩＡｇｅｎ（商標）（ＣｙｂｅｒＦｌｕｏｒ　Ｉｎｃ．，Ｔｏｒｏｎｔｏ，Ｏｎｔａｒｉｏ，Ｃａｎａｄａ）のような製品が入手可能であり、螢光標識として、４，７－ビス（クロロスルホニル）－１，１０－フェナントロリン－２，９－ジカルボン酸のユウロピウムキレートを使用する。この型の螢光標識は極めて感度が高く、時間分解螢光測定法を用いてピコモル以下の範囲で検出できる。

【００１２】

診断用薬の最も重要な特徴の１つは、疾病状態の評価精度を増大しなければならないことにある。これは、異常が疑われる特定の臓器又は軟組織への診断用薬の送達を伴うことが最も多い。目下、大きいタンパク質又は抗体に小さい分子（即ち、診断用フラグメント）を共有結合させること（「二元性」と称される）が、組織特異性を得るための選択法として大いに注目されている。

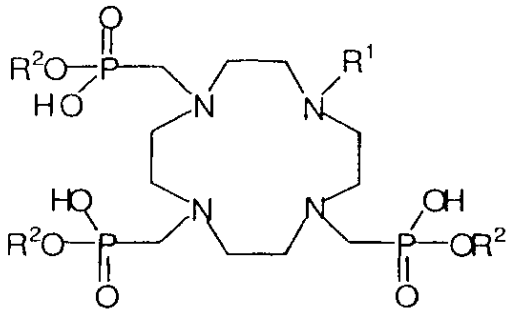
【００１３】

二元性分子のこのような例の１つは、非特許文献１８に開示されている。非特許文献１８は、抗体のような生物学的に活性な種と複合体を形成するための単一のカルボキシル基を有するサイクレン（ｃｙｃｌｅｎ；１，４，７，１０－テトラアザシクロドデカン）核をベースとするランタニドキレート化配位子を開示している。しかし、この方法は、組織特異性を得るために特化された抗体の使用を必要とするので、本質的に複雑であると共に費

用がかかる。
【００１４】
【特許文献１】
米国特許第５，３１２，９２２号（Ｅ．Ｐ．Ｄｉａｍａｎｄｉｓ）
【特許文献２】
米国特許第４，９７６，９５０号（Ｊ．Ｓｉｍｏｎ，Ｊ．Ｒ．Ｇａｒｌｉｃｈ，Ｄ．Ａ．Ｗｉｌｓｏｎ及びＫ．ＭｃＭｉｌｌａｎ）
【特許文献３】
米国特許第４，９２０，１９５号（Ｊ．Ｋａｎｋａｒｅ，Ｊ．Ｔａｋａｌｏ及びＰ．Ｐａｓａｎｅｎ）
【特許文献４】
米国特許第５，９２８，６２７号（Ｇ．Ｅ．Ｋｉｅｆｅｒ及びＤ．Ｊ．Ｂｏｒｎｈｏｐ）
【特許文献５】
米国特許第５，３１２，９２２号
【非特許文献１】
Ｊ－Ｍ．Ｄｅｖｏｉｓｓｅｌｌｅ ｅｔ ａｌ．，Ｏｐｔｉｃａｌ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ ３２（２），２３９（１９９３）
【非特許文献２】
Ｒ．Ｐ．Ｈａｕｇｌａｎｄ ａｎｄ Ａ．Ｍｉｎｔａ，”Ｄｅｓｉｇｎ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ Ｉｎｄｉｃａｔｏｒ Ｄｙｅｓ”，Ｎｏｎｉｎｖａｓｉｖｅ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ｉｎ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ．，ｅｄ．Ｂ．Ｈ．Ｓａｔｉｒ，Ｃｈａｐ．１，ｐ１（Ｗｉｌｅｙ－Ｌｉｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、ＮＹ，１９９０）
【非特許文献３】
Ｄ．Ｊ．Ｇｒｏｓｓ，”Ｑｕａｎｔｉｔａｔｉｖｅ Ｓｉｎｇｌｅ Ｃｅｌｌ Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｃｅ Ｉｍａｇｉｎｇ ｏｆ Ｉｎｄｉｃａｔｏｒ Ｄｙｅｓ”，Ｎｏｎｉｎｖａｓｉｖｅ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ｉｎ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ．，ｅｄ．Ｂ．Ｈ．Ｓａｔｉｒ，Ｃｈａｐ．２，ｐ２１（Ｗｉｌｅｙ－Ｌｉｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、ＮＹ，１９９０）
【非特許文献４】
Ｅ．Ｐ．Ｄｉａｍａｎｄｉｓ，Ｃｌｉｎ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．２１，１３９－１５０（１９８８）
【非特許文献５】
Ｃｌｉｎ．Ｃｈｉｍ．Ａｃｔａ．１９４，１９－５０（１９９０）
【非特許文献６】
Ａｎａｌ．Ｃｈｅｍ．６２，１１ ４９Ａ－１１ ５７Ａ（１９９０）
【非特許文献７】
Ｅ．Ｓｏｉｎｉ ａｎｄ Ｔ．Ｌｏｖｇｒｅｎ，Ｃｒｉｔ．Ｒｅｖ．Ａｎａｌ．Ｃｈｅｍ．１８，１０５－１５４（１９８７）
【非特許文献８】
Ａ．Ｐ．Ｂ．Ｓｉｎｈａ，Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｃｅ ａｎｄ Ｌａｓｅｒ Ａｃｔｉｏｎ ｉｎ Ｒａｒｅ Ｅａｒｔｈ Ｃｈｅｌａｔｅｓ／Ｓｐｅｃｔｒｏｓｃｏｐｙ ｉｎ Ｉｎｏｒｇａｎｉｃ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ Ｖｏｌｕｍｅ ＩＩ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ）（１９７１）
【非特許文献９】
Ｇ．Ｋａｌｌｉｓｔｒａｔｏｓ，Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ Ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ ｏｆ Ａｒｏｍａｔｉｃ Ｃｏｍｐｌｅｘｅｓ ｗｉｔｈ Ｒａｒｅ Ｅａｒｔｈｓ ａｎｄ Ｏｔｈｅｒ Ｅｌｅｍｅｎｔｓ ｏｆ ｔｈｅ ＩＩＩａ－Ｇｒｏｕｐ／Ｃｈｅｍｉｋａ Ｃｈｒｏｎｉｋａ．Ｎｅｗ Ｓｅｒｉｅｓ，１１，２４９－２６６（１９８２）
【非特許文献１０】
Ｗ．Ｐ．Ｃａｃｈｅｒｉｓ，Ａ．Ｄ．Ｓｈｅｒｒｙ，Ｉｎｏｒｇ．Ｃｈｅｍ．２６，９５

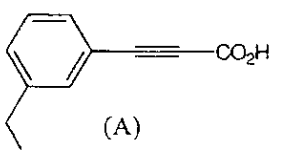
８－９６０（１９８７）
【非特許文献１１】
Ｋｉｍ ｅｔ ａｌ．，Ｉｎｏｒｇ．Ｃｈｅｍ．３４，２２３３－４３（１９９５）
【非特許文献１２】
Ｅ．Ｂａｄｅｎ，ＣＡ Ｃａｎｃｅｒ Ｊ．Ｃｌｉｎ．３７（１），４９－６２（１９８７）
【非特許文献１３】
Ｓ．Ｓｉｌｖｅｒｍａｎ，Ｊｒ． ａｎｄ Ｍ．Ｇｏｒｓｋｙ，Ｊ．Ａｍ．Ｄｅｎｔ．Ａｓｓｏｃ．１２０（５），４９５－４９９（１９９０）
【非特許文献１４】
Ｄ．Ｐ．Ｖａｒｂｅｃ，Ｔｒａｎｓ．Ｐａ．Ａｃａｄ．Ｏｐｈｔｈａｌｍｏｌ．Ｏｔｏｌａｒｙｎｇｏｌ．３２（２），１７７－１９１（１９７９）
【非特許文献１５】
Ｐ．Ｈ．Ｍａｒｋｓ ａｎｄ Ｆ．Ｇ．Ｓｃｈｅｃｈｔｅｒ，Ａｎｎ．Ｔｈｏｒａｃ．Ｓｕｒｇ．３３（４），３２４－３３２（１９８２）
【非特許文献１６】
Ｊ．Ｇｌｕｃｋｍａｎ，Ｌａｒｙｎｇｏｓｃｏｐｅ ３，９０（１９８３）
【非特許文献１７】
Ｅ．Ｐ．Ｄｉａｍａｎｄｉｓ，Ｃｌｉｎｉｃａ Ｃｈｉｍｉｃａ Ａｃｔａ １９４，１９－５０（１９９０）
【非特許文献１８】
Ｊ．Ｍ．Ｍ．ｅｔ ａｌ，”Ｓｉｍｐｌｅ，ｈｉｇｈ ｙｉｅｌｄｉｎｇ ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ ｏｆ ｔｒｉｆｕｎｃｔｉｏｎａｌ ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ ｌａｎｔｈａｎｉｄｅ ｃｈｅｌａｔｅｓ”，Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ Ｌｅｔｔｅｒｓ ４２（２００１）ｐｐ．１－３

【発明の開示】
【発明が解決しようとする課題】
【００１５】
従って、抗体のような送達分子に結合させる必要なく、体の特定の組織に局在する小分子診断用薬を使用すれば有利であろう。更に、安定な螢光ランタニドキレートが組織特異性を示すとしたら、軟組織の損傷を最小限に抑える適当な光源を照射することによってキレートの存在を目視によって確認することが可能であろう。可能性のある用途は、螢光誘導外科手術、骨又は軟組織の細胞増殖又は形態のインビボ画像化、胃腸管の検査であろう。
【課題を解決するための手段】
【００１６】
本発明は、目視可能な診断用薬として使用できる新規な組織特異的ランタニド、テルビウム、ユウロピウム又はジスプロシウムキレートに関する。詳細には、好ましいキレートは、テトラアザシクロドデカントリメチレンホスホン酸核とアンテナとして作用する側鎖配位部分とを含む式（Ｉ）のポリアザ大環状化合物から構成される。
【００１７】
本発明は、式：
【００１８】
【化１】

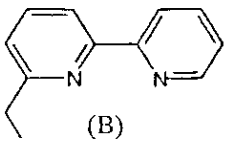


(I)

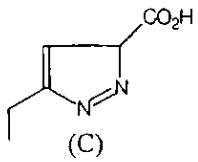
【００１９】
（式中、Ｒ[1]は、
【００２０】
【化２】



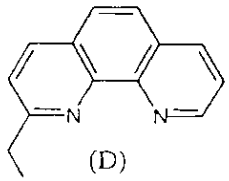
(A)



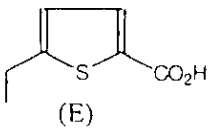
(B)



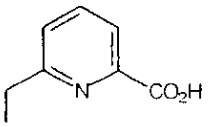
(C)



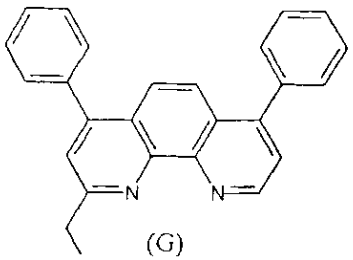
(D)



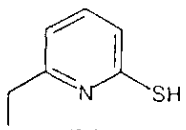
(E)



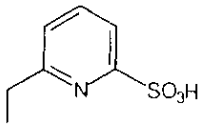
(F)



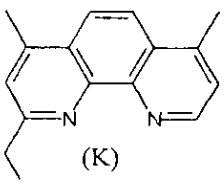
(G)



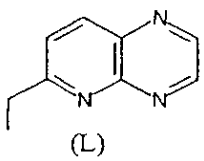
(H)



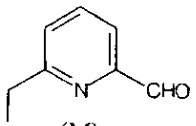
(J)



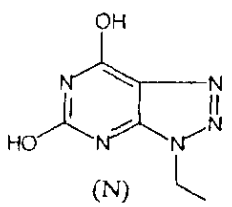
(K)



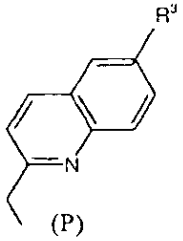
(L)



(M)



(N)

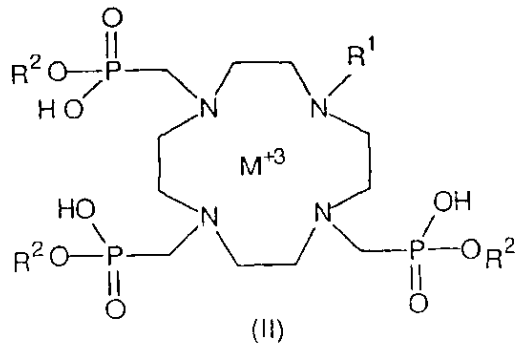


(P)

【００２１】

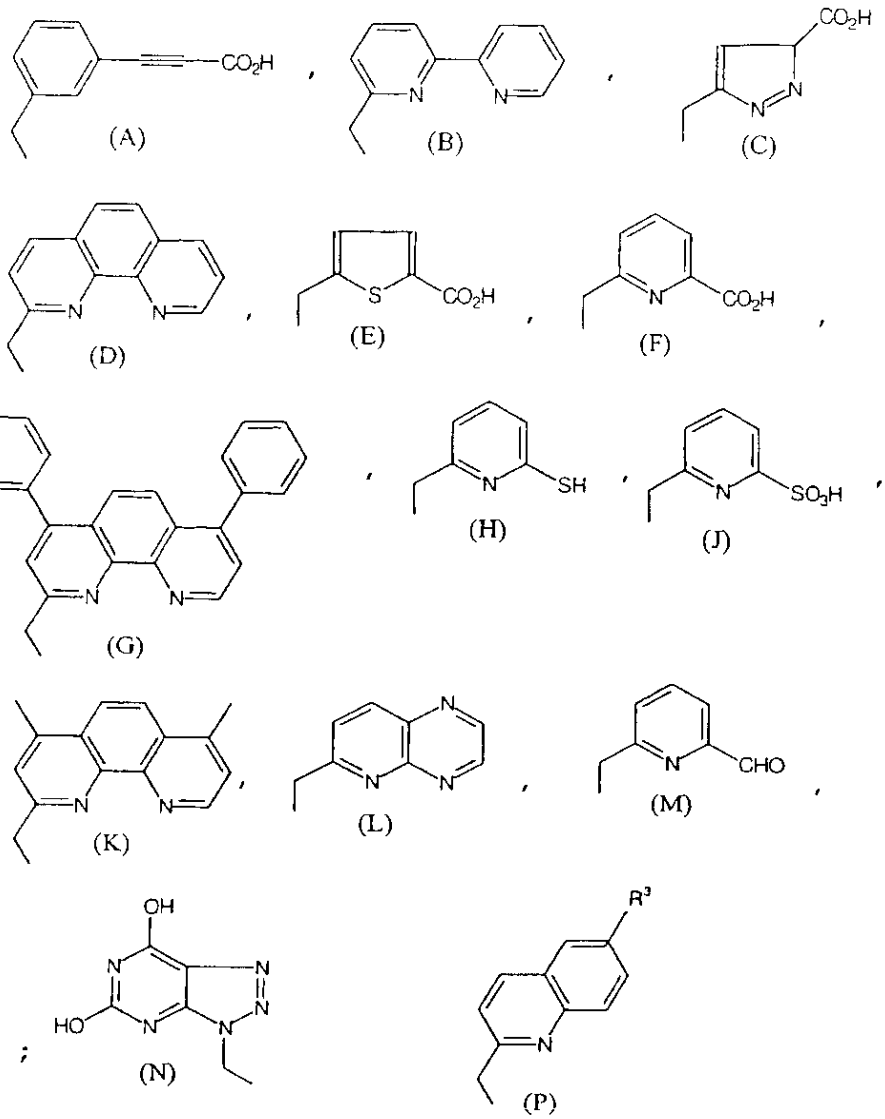
であり；
R^2はメチル、エチル、プロピル、ブチル又はＨであり；
R^3はＦ、C_1～C_4アルキル、Ｏ（C_1～C_4アルキル）又はＣｌである）
のテトラアザ大環状化合物又はそれらの医薬的に許容し得る塩である新規化合物に関する。

【００２２】
別の側面において、本発明は、式：
【００２３】
【化３】



(II)

【００２４】
（式中、R^1は
【００２５】
【化４】



【００２６】
であり；
R^2はメチル、エチル、プロピル、ブチル又はＨであり；
R^3はＦ、C_1～C_4アルキル、Ｏ（C_1～C_4アルキル）又はＣｌであり；
Ｍは、テルビウム（Ｔｂ）、ユウロピウム（Ｅｕ）、ランタニド（Ｌａ）又はジスプロシウム（Ｄｙ）の金属イオンである）
のテトラアザ大環状キレート化合物又はそれらの医薬的に許容し得る塩に関する。
【発明の効果】
【００２７】
キレートの薬液は、目標とする領域に局所適用するための医薬製剤の調製に使用する。有利なことに、これらの溶液は、従来の造影剤に比較して低濃度である。例えば、これらの溶液は、体重に関係なく、０．００１Ｍの濃度範囲である。一方、ＭＲＩ製剤のような常用の医薬製剤の場合には、溶液濃度はＭＲＩ溶液に関してはバイアル中において０．５Ｍの濃度範囲であり、投薬量は体重を基準とする。本発明の製剤は、リンス又はスワブによるなどして組織表面に適用する。このような表面適用のために、体重は投薬量の決定要因ではない。
【発明を実施するための最良の形態】
【００２８】

Ｇｏｌｄｅｎ　Ｈａｍｓｔｅｒ頬袋組織の螢光画像は、部位特異的なインビボイメージングを行うためにランタニドキレートを使用できる可能性を示している。

【００２９】

軟組織における早期段階のスペクトロスコピックイメージングの精度は、特定組織に濃縮される部位特異的分子（造影剤）を用いて著しく増大させることができる。

【００３０】

本発明のキレートに使用する金属の選択は、螢光イメージングに望ましい色及び配位子の性質に依存する。テルビウム（Ｔｂ）又はユウロピウム（Ｅｕ）の使用は、組織特異的螢光プローブの役割をする中心金属イオンとして好ましい。この型の誘導体は、口腔及び食道癌の早期検出のような組織状態の目視評価に有用であり、タンパク質との複合体形成によらずにそれらの標的に到達するであろう。更に、活性螢光物質の濃度はイムノアッセイの場合よりもはるかに高く、検出をはるかに容易にすることが予想できるであろう。

【００３１】

この錯体は、３００～３４０ｎｍの励起帯、高い量子効率及びミリ秒単位の緩和寿命（ｒｅｌａｘａｔｉｏｎ　ｌｉｆｅｔｉｍｅｓ）を有し、それらが、即発組織自己螢光の沈静後の信号収集を可能にすると共に、正常組織の螢光の範囲外のデータ収集を可能にする。本発明のキレートは、簡易化された低コストの画像化系の使用を可能にし、改良された吸光係数を有し、ＵＶ波長が長いほど（即ち、レッドシフトした励起）ほど量子効率が大きくなる。水性媒体中で直ちに消光するか又は軟組織の損傷を引き起こし得る短波長である他の螢光キレートとは異なり、可視螢光が水中で縮退しないため、本発明のキレートは動物のインビボ（ｉｎ　ｖｉｖｏ）画像化への適用に適し、また、赤色光波長は、本発明のキレートは軟組織の損傷を起こす恐れがあまりない。更に、この系列の大環状配位子に由来するキレートは、最も熱力学的且つ動力学的に不活性なランタニド錯体の中で、金属イオン毒性が重要である生物学的研究のための重要な検討材料である。

【００３２】

本発明に関して式（Ｉ）及び（ＩＩ）に使用する用語は更に以下のように定義する。「$Ｃ_{1}$～$Ｃ_{4}$アルキル」は直鎖及び分岐鎖アルキル基をいずれも含む。「動物」は、温血哺乳動物、好ましくはヒトを含む。本明細書中で使用する「錯体」は、少なくとも１個の金属原子がキレート化されているか金属イオン封鎖されている、金属イオンで錯化された本発明の化合物、例えば式（Ｉ）の化合物の錯体を意味する。

【００３３】

本明細書中で使用する「医薬的に許容し得る塩」は、充分に無毒性であって動物、好ましくは哺乳類の診断に使用できる式（Ｉ）又は（ＩＩ）の化合物の任意の塩又は塩混合物を意味する。従って、塩は本発明に適合して有用である。有機及び無機供給源から標準的な反応によって形成されるこれらの塩の代表例としては、例えば次のものが挙げられる。硫酸、塩酸、燐酸、酢酸、コハク酸、クエン酸、乳酸、マレイン酸、フマル酸、パルミチン酸、コール酸、パルモ酸（ｐａｌｍｏｉｃ　ａｃｉｄ）、ムチン酸、グルタミン酸、グルコン酸、ｄ－樟脳酸、グルタル酸、グリコール酸、フタル酸、酒石酸、蟻酸、ラウリン酸、ステリック・アシド（ｓｔｅｒｉｃ　ａｃｉｄ）、サリチル酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、ソルビン酸、ピクリン酸、安息香酸、桂皮酸、及び他の適当な酸。又、アンモニウム又は１－デオキシ－１－（メチルアミノ）－Ｄ－グルシトール、アルカリ金属イオン、アルカリ土類金属イオン及び他の同様なイオンのような有機及び無機供給源から標準的反応によって形成された塩も含まれる。特に好ましいのは、塩がカリウム、ナトリウム又はアンモニウムである式（Ｉ）又は（ＩＩ）の化合物の塩である。前記塩の混合物も含まれる。

【００３４】

言うまでもなく、式（Ｉ）又は（ＩＩ）の化合物の遊離酸も使用でき、更に、例えば窒素原子がプロトン化される場合（ＨＣｌ塩が形成される場合）には化合物のプロトン化型も使用できる。

【００３５】

錯体は当業界でよく知られた方法によって調製する。従って、例えば、Ｃｈｅｌａｔｉｎｇ Ａｇｅｎｔｓ ａｎｄ Ｍｅｔａｌ Ｃｈｅｌａｔｅｓ，Ｄｗｙｅｒ ＆ Ｍｅｌｌｏｒ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ（１９６４），Ｃｈａｐｔｅｒ ７を参照されたい。また、Ｓｙｎｔｈｅｔｉｃ Ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ ａｎｄ Ｕｔｉｌｉｚａｔｉｏｎ ｏｆ Ａｍｉｎｏ Ａｃｉｄｓ，（Ｋａｍｅｋｏら編）Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ（１９７４）のアミノ酸製造方法も参照されたい。錯体調製の一例は、ビシクロポリアザマクロシクロホスホン酸を水性条件下でｐＨ５～７において金属イオンと反応させることを含む。形成される錯体は、例えば配位子からの核種の解離に対して安定である安定核種組成物を生じる。

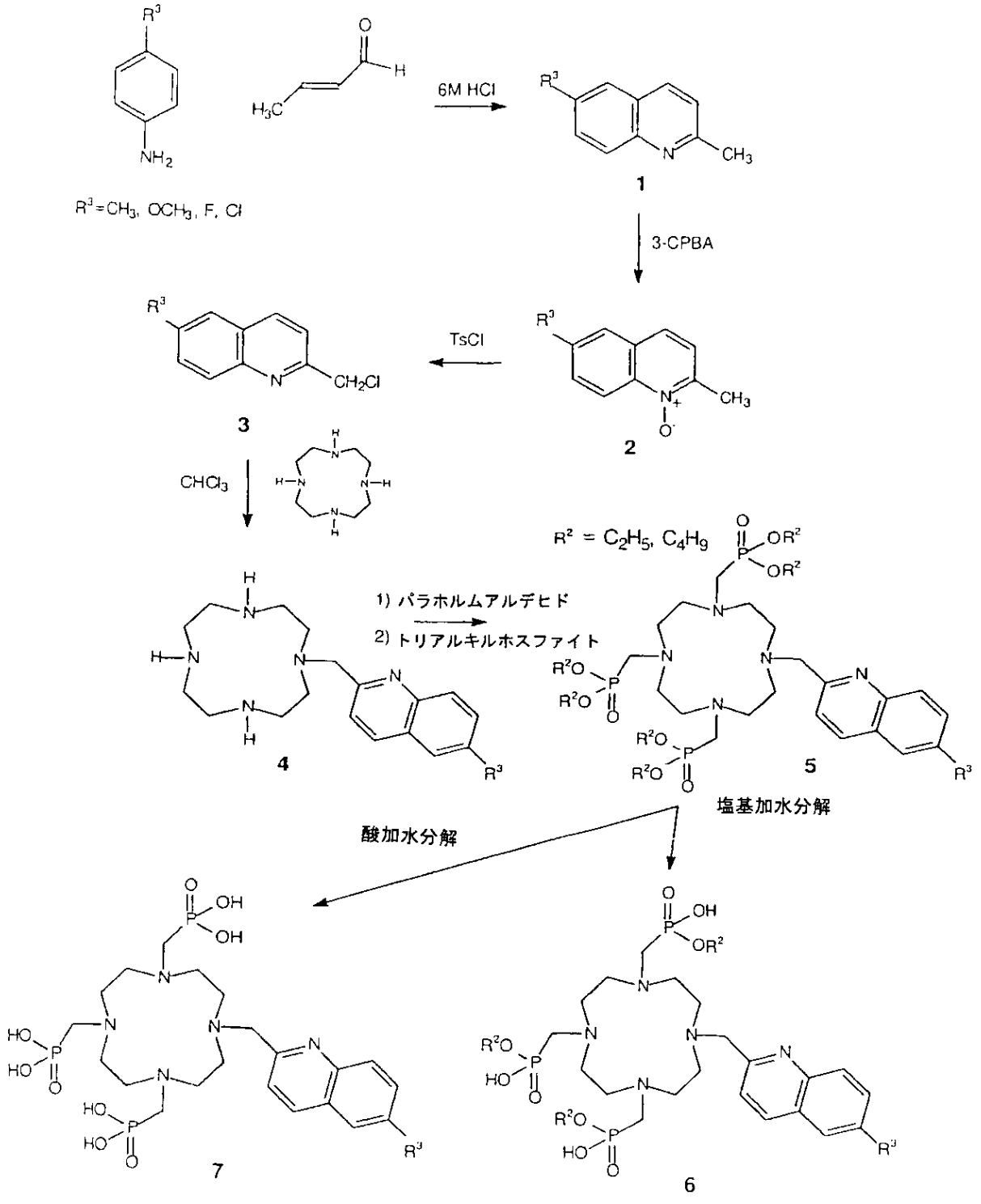
【００３６】

以下の図式１は、本発明の錯体の調製に関する詳細な説明である。

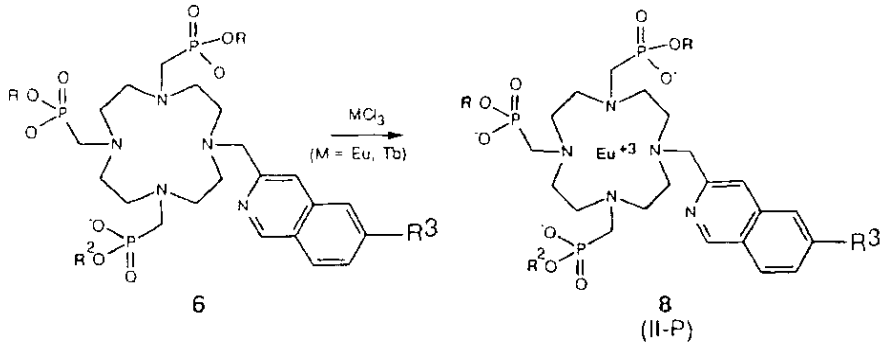
図式１

【００３７】

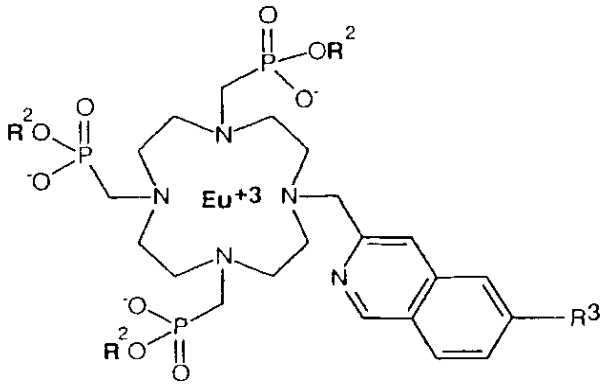
【化５】


R3
NH2
R3=CH3, OCH3, F, Cl
O
H
H3C
6M HCl
R3
N
CH3
1
3-CPBA
R3
N+
O-
CH3
2
TsCl
R3
N
CH2Cl
3
CHCl3
H
N
H-N
N-H
N
H
4
1) パラホルムアルデヒド
2) トリアルキルホスファイト
R2 = C2H5, C4H9
O
OR2
P
OR2
R2O
R2O
P
O
5
塩基加水分解
酸加水分解
OH
OH
HO
HO
6
7

【００３８】
【化６】



6 8 (II-P)



【００３９】
図式１は、１個のキノリン部分を有する１２員テトラアザ大環状構造を調製するための合成の一実施態様を示している。その他の実施態様は、以下の実施例中に詳述する。Ｊ．Ｏｒｇ．Ｃｈｅｍ．４２，９１１（１９７７）に記載された基本手順に従って、４－置換アニリンを６Ｍ塩酸中でブチルアルデヒドと反応させて、２－メチル－６－置換キノリン（１）を形成する。次いで、このキノリン化合物を３－ＣＰＢＡ（３－クロロ－ペルオキシ安息香酸）と反応させて、約９８重量％で２－メチル－６－置換キノリンＮ－オキシド（２）を生成する。塩化トシル（若しくは同様な脱保護剤？）による脱保護と同時に起こるメチル－クロリネーション（ｍｅｔｈｙｌ－ｃｈｌｏｒｉｎａｔｉｏｎ）によって、２－クロロメチル－６－置換キノリン（３）が生成される（３５～７５％；出発原料となる）。最後の２つの工程は、Ｊｏｈｎ Ｂｕｔｅｒａ ａｎｄ Ｊｅｈａｎ Ｂｅｇｌｉ［Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．３４，３２１２（１９９１）］の方法による。
【００４０】
この出発キノリン（３）は次に、室温においてクロロホルム中でＣｙｃｌｅｎ（１，４，７，１０－テトラアザシクロドデカン）と反応させて、１－［２－（７－置換）－メチレンキノリニル］－１，４，７，１０－テトラアザシクロドデカン（４）を形成する。
【００４１】
次に、この大環状化合物をテトラヒドロフラン（ＴＨＦ）中でトリアルキルホスファイト（例えば、トリブチルホスファイト又はトリエチルホスファイト）及びパラホルムアルデヒドと反応させることによって、Ｎ－アルキルホスホン酸エステルを合成する。得られたホスホン酸エステル５を次に、塩基性条件下で加水分解して、１－［２－（６－置換）メチレンキノリニル］－４，７，１０－トリス（メチレンホスホン酸ｎ－アルキルエステル）－１，４，７，１０－テトラアザシクロドデカン６を生成するか、酸性条件下で加水分解してホスホン酸誘導体７を得る。これらの配位子系は次に、Tb^{+3}、Eu^{+3}のような適当なランタニドイオン、又はＬａ、Ｙ、Ｓｃ、Ｓｍ、Ｇｄ、Ｄｙ、Ｈｏ、Ｅｒ、Ｔｍ、Ｙｂ及びＬｕのような他の金属イオンで錯化すると、望ましい螢光キレートを生じる。

【００４２】
本発明の錯体は、少なくとも１：１、好ましくは１：１～３：１、より好ましくは１：１～１．５：１の配位子対金属モル比で投与する。錯化されていない配位子は動物には有毒である可能性があるか、又は心不全若しくは低カルシウム性痙攣を引き起こす可能性があるので、大過剰量の配位子は望ましくない。
【００４３】
「錯体」及び「キレート」は、式（ＩＩ）に示されるような、式（Ｉ）の配位子の付いた金属イオンを意味するのに用いる。
【００４４】
六水和物としての$LaCl_3$、$TbCl_3$及び$EuCl_3$はＡｌｄｒｉｃｈ　Ｃｈｅｍｉｃａｌから購入する。
【００４５】
本発明の錯体は経口液剤として投与するのが好ましく、前述のように診断用薬として有用である。これらの製剤は、使用前の適当な時間に２つの成分（即ち、配位子と金属）を混合するようなキットの形態であることができる。予備混合する場合であってもキットとして使用する場合であっても、製剤は通常、医薬的に許容し得る担体を必要とする。
【００４６】
本発明の組成物は懸濁液又は溶液の形態のいずれであってもよい。適当な製剤の調製において、一般的に、塩の水溶性は酸型よりも大きいことが認められるであろう。溶液型では、錯体（又は必要な場合には個々の成分）を生理学的に許容し得る担体中に溶解させる。このような担体は、適当な溶媒、必要ならばベンジルアルコールのような保存剤、及び緩衝剤を含む。有用な溶媒としては、例えば水、水性アルコール、グリコール及びホスホン酸若しくは炭酸エステルが挙げられる。このような水溶液に含まれる有機溶媒は５０容量％以下である。
【００４７】
懸濁液は、補助薬の使用の有無に関わらず、担体として液体懸濁媒を必要とする本発明の組成物である。懸濁媒は、例えば水性ポリビニルピロリドン、植物油若しくは高度精製鉱油のような不活性油又は水性カルボキシメチルセルロースであることができる。必要に応じて懸濁液中に錯体を保持するための適当な生理学的に許容し得る補助薬は、カルボキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ゼラチン及びアルギン酸塩のような増粘剤の中から選択できる。多くの界面活性剤、例えばレシチン、アルキルフェノール、ポリエチレンオキシド付加物、ナフタレンスルホネート、アルキルベンゼンスルホネート及びポリオキシエチレンソルビタンエステルは、沈殿防止剤としても有用である。
【００４８】
検査前に組織を螢光キレートでリンスする用途の場合には、キレート溶液は、個々の要件に応じて濃度を変化させることができる。局所適用に標準的な濃度は、適当な水性製剤においては10^{-2}～10^{-7}Ｍである。これらの濃度は、静脈注射によって０．１ｍＭ／Ｋｇ体重で投与される標準的なＭＲＩ造影剤（０．５Ｍ）よりも格段に低い。
【００４９】
錯体及び／又は複合体は、インビボ又はインビトロ（ｉｎ　ｖｉｔｒｏ）で使用するために製剤化できる。製剤化複合体の好ましい用途は、動物、特にヒトにおける病的状態（例えば、口腔又は食道癌、結腸直腸、頚部）の診断である。
【００５０】
従って、本発明は、生理学的に許容され得る担体、賦形剤又はビヒクルと共に使用する。このような製剤の調製方法はよく知られている。これらの製剤は、懸濁剤、液剤又は他の適当な製剤の形態であることができる。補助薬の使用の有無に関わらず、生理学的に許容し得る懸濁媒を使用できる。
【００５１】
診断には、「有効量」の製剤を用いる。有利なことに、この製剤は局所適用できるため、注射用液剤に比べて非侵襲的である。投与量は、その動物の疾患及び身体的パラメーター

、例えば検査すべき組織の表面積、使用する装置に基づく画像の検出能、及び病変組織中におけるキレートの取り込み速度に応じて異なるであろう。この後の方の点は、キレート濃度によって影響される可能性があり、疾病型に基づいて最適化するものとする。本発明の製剤を用いたインビボ診断も考えられる。

【００５２】

本発明の式（Ｉ）の化合物を用いて形成された式（ＩＩ）の錯体は、微視的インターフェースと、インビボ画像を可能にする遠隔画像化技術とを併用する発光検出方法を用いて画像化する。このような画像化に適当な方法は、米国特許第５，９２８，６２７号及び第５，５０７，２８７号に記載されている。

【００５３】

本発明のキレートは、例えば口腔、皮膚及び頚部組織のような露出組織への局所適用に適している。このような型の適用の場合には、キレートは、単純な集束紫外線光源を用いて励起させることができる。

【００５４】

理論によって拘束するつもりはないが、本発明の有利な結果が得られるのは、本発明の全てのキレートに共通することであるが、陽イオンが１２員大環状化合物より上の先端に位置し且つホスホン酸配位基とのイオン相互作用によって所定の位置に保持されるためであると考えられる。組織選択性をもたらす化学修飾を可能にするのは、大環状構造内における官能基化窒素の位置及び配位基というこの独特な組み合わせである。

【００５５】

水溶液中におけるＬａ、Ｔｂ、Ｅｕ及びＤｙのようなランタニド塩の螢光は、このようなイオンが必要なエネルギーを効率的には吸収しないために非常に弱い。しかし、これらのイオンの螢光は、金属を適当な有機配位子によって錯化すると、劇的に増大させることができる。

【００５６】

これらの独特な錯体において、式（Ｉ）の配位子は紫外線を吸収し、基底状態（S_0）から励起状態（S_1）に励起される。配位子が最初の基底状態に戻り始めるにつれて、エネルギーの一部は配位子の三重項状態からランタニドイオンの適当な４ｆエネルギーレベルへと移される。配位子の三重項状態からエネルギーを受け取ると、イオンは共鳴状態になり、輻射遷移を受けて、金属イオンの固有線発光（イオン螢光）を生じることができる。これらのキレート構造において、配位子は本質的に、金属イオンに移され且つ可視光の形態で再発光されるエネルギーを吸収するためのアンテナとして作用する。また、干渉を最小にするためには、金属イオンが放射するのとは著しく異なる波長のエネルギーを吸収する配位子を有するのが有利である（ストークシフト）。

【００５７】

これまで数多くの螢光キレートが報告されている。これらのキレートの大多数は、螢光が水によって消光されるため、無水媒体中でのみ効力がある。本発明のキレートは、水性環境中で安定な螢光キレートを形成することができるので、生物学的用途の場合にははるかに優れている。大環状環の一部として又は側基としてのピリジン官能基の独特の配置は、金属イオンへの効率的なエネルギー伝達を可能にすると共に、全体的なキレート安定性を増大する。

【００５８】

本発明を、以下の実施例の検討によって更に明確にする。これらの実施例は、本発明を単に代表するものである。

【実施例】

【００５９】

以下の実施例に関して、化学名の後に記載した括弧内の数字は、図式１中の対応する構造の下に示された構造番号を表す。

【００６０】

一般的実験

ＮＭＲデータは、２５０ＭＨｚで動作するＢｒｕｋｅｒ　Ｓｐｅｃｔｒｏｍｅｔｅｒで得た。サンプルはCDC_3中で又はD_2O中でジオキサンを用いて調製した。記録した化学シフトは全て、外部基準としてのＴＭＳ（テトラメチルシラン）又は１，４－ジオキサンを基準にして記録してある。

【００６１】

配位子及びキレートの吸収スペクトルは、Ｖａｒｉａｎ／Ｃａｒｙ　１、紫外線／可視分光光度計で得た。

【００６２】

化学薬品は全て、Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｃｏｍｐａｎｙから購入し、それ以上の精製をせずに用いた。

【００６３】

特に断らない限り、全ての部及び百分率は重量に基づく。

【００６４】

キレートに関する頭字語

表Ｉは、記載した側基を有するキレート剤を表すのに以下の実施例で用いる頭字語を示す。表Ｉに示した全てのキレート剤に関して、R^1はキノリン（式（Ｉ）及び（ＩＩ）においてはＰ）である。

【００６５】

【表１】

表Ｉ

実施例	R2	R3	キレート	頭字語
10	C_2H_5	CH_3	ユウロピウム－キノリルメチル（環状トリホスホネートエチルエステル）	Eu-QM(CTPE)
11	C_4H_9	CH_3	ユウロピウム－キノリルメチル（環状トリホスホネートブチルエステル）	Eu-QM(CTPB)
12	H	CH_3	ユウロピウム－キノリルメチル（環状トリホスホン酸）	Eu-QM(CTPH)
13	H	Cl	ユウロピウム－キノリルメチル（環状トリホスホン酸）	Eu-QCl(CTPH)
14	H	F	ユウロピウム－キノリルメチル（環状トリホスホン酸）	Eu-QF(CTPH)

【００６６】

出発原料

実施例１～３は、６－メチル置換キノリン側基の調製を記載している。６－クロロ、６－メトキシ及び６－フルオロ類似体は、図式１のパラトルイジンの代わりに適当な６－クロロ、６－メトキシ又は６－フルオロアニリンを用いることによって同様に調製する。これらの他の誘導体に関する、その後の配位子及びキレート合成は以下の実施例と同じである。

【００６７】

実施例１

２，６－ジメチルキナルジン（１，R_3＝メチル）の合成

【００６８】

パラトルイジン（１０ｇ，０．０９３３モル）を１００ｍＬの６Ｍ　ＨＣｌ中に溶解させ、９０℃に加熱した（激しく撹拌しながら）。この混合物に６時間にわたってクロトンアルデヒド（６．６２ｇ，０．０９４５モル）を滴加し、その後、更に２時間反応を加熱しながら撹拌した。完了した反応を室温まで冷ました。次いで、$ZnCl_2$（１２．３ｇ，０．０９３３モル）をこの溶液に添加し、３０分間激しく撹拌した。次に、溶液を０℃に冷却し、更に１５分間撹拌した。次いで、沈殿物を真空濾過し、冷却した３Ｍ　ＨＣｌで洗浄した。次に、沈殿物をビーカーに移し、イソプロパノールと共に３０分間撹拌し、濾過し、追加のイソプロパノールで洗浄し、最後に冷却エーテルで洗浄した。次いで、固体をビーカーに移し、ビーカーに水１００ｍＬを添加し、撹拌しながら０℃に冷却した。この溶液にNH_4OH（ａｑ）３０ｍＬを添加し、１０分間撹拌した。得られた混合物をジクロロメタンで数回抽出した。合したジクロロメタン層を、$MgSO_4$を用いて乾燥させ、蒸発させて、暗黄色の固体７．２ｇ（収率４９％）を生成した。この固体をヘキサン中で再結晶させて、黄色固体を生成した。H^1　ＮＭＲ（$CDCl_3$）：　δ　２．５０（ｓ，３Ｈ），２．７０（ｓ，３Ｈ），７．２３～７．４５（ｍ，３Ｈ），７．９４～７．９９（ｍ，２Ｈ）。

【００６９】

実施例２

２，６－ジメチルキナルジンＮ－オキシド（２，R^3＝メチル）の合成

【００７０】

２，６－ジメチルキナルジン（１）（５ｇ，０．０３１８モル）の１，２－ジクロロエタン（１３０ｍＬ）中撹拌溶液に、３－ＣＰＢＡ（３－クロロ－ペルオキシ安息香酸）（７２％活性７．４３ｇ，０．０３１０モル）を添加した。次いで、反応を４０℃に２４時間加熱した。反応の完了した混合物を室温に冷却し、濃縮し、１０％　K_2CO_3及び最小量の酢酸エチルを添加して、２相混合物を生成した。その後、沈殿物が両層に形成され、それを濾過し、水洗によって微量のK_2CO_3を除去し、乾燥して、４．６７ｇ（８５％）を得た。H^1　ＮＭＲ（$CDCl_3$）：　δ　２．５２（ｓ，３Ｈ），２．６６（ｓ，３Ｈ），７．２８～７．５６（ｍ，４Ｈ），８．７０～８．７９（ｍ，１Ｈ）。

【００７１】

実施例３

２－（クロロメチル）－６－メチルキノリン（３，R^3＝メチル）の合成

【００７２】

ｐ－トルエンスルホニルクロリド（６．１９ｇ，０．０３２５モル）のジクロロエタン（７５ｍＬ）中撹拌溶液に、N_2雰囲気下において２，６－ジメチルキナルジンＮ－オキシド（２）（５ｇ、０．０２８９モル）を添加した。次いで、反応混合物を２４時間１００℃に加熱し、冷却し、濃縮し、１０％　K_2CO_3及び酢酸エチルで抽出した。有機層を$MgSO_4$で乾燥させ、濃縮し、小さいシリカフラッシュカラム（ジクロロメタン：ヘキサン２：１）で精製した。次に、得られた黄色固体をヘキサン中で再結晶させて、白色固体３．３１ｇ（６０％）を得た。H^1　ＮＭＲ（$CDCl_3$）：　δ　２．５０（ｓ，３Ｈ），４．８０（ｓ，２Ｈ），７．４０～７．５０（ｍ，２Ｈ），７．５８～７．６１（ｄ，１Ｈ），８．０２～８．９９（ｍ，１Ｈ），８．１１～８．１４（ｄ，１Ｈ）。

【００７３】

配位子の合成

実施例４

Ｎ－（６－メチル－２－キノリルメチル）－１，４，７，１０－テトラアザシクロドデカン（４，R^1＝キノリル，R^3＝メチル）の合成

【００７４】

サイクレン（３．５２ｇ，０．０２０４モル）のクロロホルム（５２５ｍＬ）中撹拌溶液に２－（クロロメチル）－６－メチルキノリン（３）（２ｇ，０．０１０４モル）を添加した。次に、ＴＬＣによって完了が確認されるまで反応を撹拌し、濃縮し、勾配溶離系（$CHCl_3$：ＭｅＯＨ　５０：１から始めて、$CHCl_3$：ＭｅＯＨ：NH_4OH　１５０

：４：１、１００：４：１、５０：４；１、そして最後に２０：４：１）を用いてシリカ上で精製して、淡黄色油２．５４ｇ（７５％）を得た。H^1 ＮＭＲ（$CDCl_3$）：δ ２．３５～３．１５（ｍ，２２Ｈ），３．８７（ｓ，２Ｈ），７．３３～７．４２（ｍ，２Ｈ），７．５８～７．６２（ｄ，１Ｈ），７．９４～８．０７（ｍ，２Ｈ）。

【００７５】

実施例５

Ｎ－（６－フルオロ－２－キノリルメチル）－１，４，７，１０－テトラアザシクロドデカン（４，R^1＝キノリル，R^3＝Ｆ）の合成

サイクレン（３．５２ｇ、０．０２０４モル）のクロロホルム（５２５ｍＬ）中撹拌溶液に２－（クロロメチル）－６－フルオロキノリン（２ｇ、０．０１０２モル）を添加した。次いで、ＴＬＣによって完了が確認されるまで反応を撹拌し、濃縮し、勾配溶離系（$CHCl_3$：ＭｅＯＨ　５０：１から始めて、$CHCl_3$：ＭｅＯＨ：NH_4OH　１５０：４：１、$CHCl_3$：ＭｅＯＨ：NH_4OH　１００：４：１で繰り返し、$CHCl_3$：ＭｅＯＨ：NH_4OH　５０：４：１で再び繰り返し、そして最後に$CHCl_3$：ＭｅＯＨ：NH_4OH　２０：４：１）を用いてシリカ上で精製して、淡黄色油２．５４ｇ（７５％）を得た。これを放置によって凝固させて、オフホワイトの固体を得た。H^1 ＮＭＲ（$CDCl_3$）：δ ２．３５～３．１５（ｍ，１９Ｈ），３．８７（ｓ，２Ｈ），７．３３～７．４２（ｍ，２Ｈ），７．５８～７．６２（ｄ，１Ｈ），７．９４～８．０７（ｍ，２Ｈ）。

【００７６】

実施例６

Ｎ－（６－メチル－２－キノリルメチル）－Ｎ’，Ｎ’’，Ｎ’’’－トリス（メチレンホスホン酸）－１，４，７，１０－テトラアザシクロドデカン（７，R^1＝キノリル、R^2＝Ｈ、R^3＝メチル）の合成

【００７７】

Ｎ－（６－メチル－２－キノリルメチル）－１，４，７，１０－テトラアザシクロドデカン（４）（１ｇ，０．００３０５モル）の無水ＴＨＦ中撹拌溶液にN_2雰囲気下でパラホルムアルデヒド（０．２７６ｇ、０．００９１８モル）を添加した。反応を室温で３時間撹拌した。次いで、この混合物にトリブチルホスファイト（２．３０ｇ，０．００９１８モル）をゆっくりと添加し、溶液が完全な透明になるまで撹拌した。反応の完了した混合物を濃縮し、高真空下で２４時間乾燥させて、淡黄色油を生成した。得られた油を６ＭＨＣｌ（５０ｍＬ）中に溶解させ、撹拌しつつ穏やかに還流させながら４日間加熱した。溶液を冷却し、過剰のＨＣｌを水との共沸蒸留によって除去して、淡黄色固体を生成した。次いで、必要ならば、無水イソプオロピルアルコールによる再結晶によって生成物を更に精製して、白色固体２．１７ｇ（９０％）を得た。この化合物は完全にプロトン化された形態で単離された。H^1 ＮＭＲ（D_2O）：δ ２．４５～３．８０（ｂｒ ｍ，２５Ｈ），４．０７（ｓ，２Ｈ），７．６７～７．７４（ｍ，２Ｈ），７．８７～７．９１（ｄ，１Ｈ），８．１８～３５（ｑｒ １Ｈ），８．７９～８．８４（ｄ，１Ｈ）。

【００７８】

実施例７

Ｎ－（６－メチル－２－キノリルメチル）－Ｎ’，Ｎ’’，Ｎ’’’－トリス（メチレンホスホン酸ブチルエステル）－１，４，７，１０－テトラアザシクロドデカン（６，R^1＝キノリル，R^2＝C_4H_9，R^3＝メチル）の合成

【００７９】

Ｎ－（６－メチル－２－キノリルメチル）－１，４，７，１０－テトラアザシクロドデカン（４）（１ｇ，０．００３０５モル）の無水ＴＨＦ（５０ｍＬ）中撹拌溶液にN_2雰囲気下でパラホルムアルデヒド（０．２７６ｇ，０．００９１８モル）を添加した。反応を室温で３時間撹拌した。次いで、トリブチルホスファイト（２．３０ｇ、０．００９１８モル）を混合物に添加し、溶液が完全な透明になるまで撹拌した。反応の完了した混合物を濃縮し、高真空下で２４時間乾燥させて、淡黄色油を得た。次いで、この油を、溶解さ

せるのに充分なジオキサンを用いてH_2O　２０ｍＬ中に溶解させた２７当量のＫＯＨと共に４日間還流させた。次に、得られた混合物の容量を真空下で減少させて、粘度の高い油を生成した。次いで、溶媒の濾過及び除去をしながら、クロロホルム濃度が次第に増加する一連のメタノール／クロロホルム溶液でこの油を洗浄した。次に、得られた油を最小量のクロロホルム中に溶解させてから、溶液が曇りを生じるまでアセトニトリルを添加した。混合物を放置して、純粋な生成物を沈殿させ、次いでそれを濾過し、水中に溶解させ、凍結乾燥して、わずかに黄色の固体０．５４１ｇ（２０％）を生成した。H^1　ＮＭＲ（D_2O）：　δ　０．７５～０．８５（ｍ，９Ｈ），１．１８～１．４５（ｍ，６Ｈ），１．４８～１．５５（ｍ，６Ｈ），１．９１～３．１０（ｂｒ　ｍ，１９Ｈ），３．６５～３．８２（ｂｒ，１２Ｈ），４．１０～４．２１（ｂｒ，２Ｈ），７．３２～７．４１（ｍ，１Ｈ），７．５０～７．６１（ｂｒ，１Ｈ），７．８０～７．８８（ｄ，１Ｈ），７．９２～８．０１（ｍ，１Ｈ），８．２０～８．３１（ｄ，１Ｈ）。

【００８０】

実施例８

Ｎ－（６－メチル－２－キノリルメチル）－Ｎ’，Ｎ’’，Ｎ’’’－トリス（メチレンホスホン酸エチルエステル）－１，４，７，１０－テトラアザシクロドデカン（６，R^1＝キノリル，R^2＝C_2H_5，R^3＝メチル）の合成

【００８１】

Ｎ－（６－メチル－２－キノリルメチル）－１，４，７，１０－テトラアザシクロドデカン（４）（１ｇ，０．００３０５モル）の無水ＴＨＦ（５０ｍＬ）中撹拌溶液にN_2雰囲気下においてパラホルムアルデヒド（０．２７６ｇ、０．００９１８モル）を添加した。反応を室温で３時間撹拌した。次いで、トリエチルホスファイト（１．５２４ｇ，０．００９１８モル）を混合物に添加し、溶液が完全な透明になるまで撹拌した。反応の完了した混合物を濃縮し、高真空下で２４時間乾燥させて、淡黄色油を得た。次いで、この油を、溶解させるのに充分なジオキサンを用いてH_2O　２０ｍＬ中に溶解させた２７当量のＫＯＨと共に４日間還流させた。次に、得られた混合物の容量を真空下で減少させて、粘度の高い油を生成した。次いで、溶媒の濾過及び除去をしながら、クロロホルム濃度が次第に増加する一連のメタノール／クロロホルム溶液でこの油を洗浄した。次に、得られた油を最小量のクロロホルム中に溶解させてから、溶液が曇りを生じるまでアセトニトリルを添加した。混合物を放置して、純粋な生成物を沈殿させ、次いでそれを濾過し、水中に溶解させ、凍結乾燥して、わずかに黄色の固体０．５２０ｇ（２１％）を生成した。H^1　ＮＭＲ（D_2O）：　δ　０．８７（ｔ，６Ｈ），１．０７（ｔ，３Ｈ），２．４５（ｓ，３Ｈ），２．４９～３．０９（ｂｒ　ｍ，２５Ｈ），３．４７（ｐ，４Ｈ），３．７６（ｐ，２Ｈ），３．８９（ｓ，２Ｈ），７．５５（ｍ，３Ｈ），７．７６（ｄ，１Ｈ），８．１５（ｄ，１Ｈ）。

【００８２】

実施例９

Ｎ－（６－フルオロ－２－キノリルメチル）－Ｎ’，Ｎ’’，Ｎ’’’－トリス（メチレンホスホン酸）－１，４，７，１０－テトラアザシクロドデカン（７，R^1＝キノリル（ＩＩ－Ｐ），R^3＝Ｆ）の合成

【００８３】

Ｎ－（６－フルオロー２－キノリルメチル）－１，４，７，１０－テトラアザシクロドデカン（１ｇ，０．００３０２モル）の無水ＴＨＦ（５０ｍＬ）中撹拌溶液にN_2雰囲気下でパラホルムアルデヒド（０．２９８ｇ，０．００９４２モル）を添加した。

反応を室温で３時間撹拌した。次いで、トリブチルホスファイト（２．４８ｇ，０．００９４２モル）をゆっくりと混合物に添加し、溶液が完全な透明になるまで撹拌した。反応の完了した混合物を濃縮し、高真空下で２４時間乾燥させて、淡黄色油を得た。得られた油を６Ｍ　ＨＣｌ（５０ｍＬ）に溶解させ、撹拌しつつ穏やかに還流させながら４日間加熱した。溶液を冷却し、過剰のＨＣｌを、水との共沸蒸留によって除去して、淡黄色固体を生成した。次いで、必要ならば、無水イソプロピルアルコールによる再結晶によって生

成物を更に精製して、白色固体２．１７ｇ（９０％）を得た。この化合物は完全にプロトン化された形態で単離された。H^1 ＮＭＲ（D_2O）：δ ２．４５～３．８０（ｂｒ ｍ，２２Ｈ），４．０７（ｓ，２Ｈ），７．６７～７．７４（ｍ，２Ｈ），７．８７～７．９１（ｄ，１Ｈ），８．１８～３５（ｑｒ １Ｈ），８．７９～８．８４（ｄ，１Ｈ）。

【００８４】

キレートの合成

実施例１０及び１１

Ｅｕ－ＱＭ（ＣＴＰＥ）及びＥｕ－ＱＭ（ＣＴＰＢ）の調製

【００８５】

Ｎ－（６－メチル－２－キノリルメチル）－Ｎ’，Ｎ’’，Ｎ’’’－トリス（メチレンホスホン酸ブチル（R^2＝ｎ－ブチル）又はエチル（R^2＝エチル）エステル）－１，４，７，１０－テトラアザシクロドデカン（６）のカリウム塩（３００ｍｇ）を蒸留水１００ｍＬに溶解させた。最初は約１０．５であった溶液のｐＨを次に、稀塩酸を用いて６．５に調整した。塩化ユウロピウム六水和物（１当量）を蒸留水５０ｍＬ中に溶解させ、撹拌しながら配位子溶液に滴加した。ｐＨが低下し始めた時には、水酸化カリウム稀薄溶液でｐＨを約６に保持した。ユウロピウム塩全てを添加し終えた後、ｐＨが約６．４に落ち着いた時、水酸化カリウムの添加を終了させた。次いで、溶液を凍結乾燥し、クロロホルム中に再溶解させ、セライトを通して濾過した。次いで、得られた濾液を濃縮して、ガラス状固体を生成した。次に、固体を水中に吸収させ、ミクロフィルターを通して濾過して、Ｅｕ（ＯＨ）$_3$を除去し、凍結乾燥して、綿状白色固体を生成した。

【００８６】

実施例１２

Ｅｕ－ＱＭ（ＣＴＰＨ）の調製

【００８７】

Ｎ－（６－メチル－２－キノリルメチル）－Ｎ’，Ｎ’’，Ｎ’’’－トリス（メチレンホスホン酸）－１，４，７，１０－テトラアザシクロドデカン（７）の塩酸塩（３００ｍｇ）を蒸留水１００ｍＬに溶解させた。最初は約４．５であった溶液のｐＨを次に、稀水酸化カリウムを用いて６．５に調整した。塩化ユウロピウム六水和物（１当量）を蒸留水５０ｍＬ中に溶解させ、撹拌しながら配位子溶液に滴加した。ｐＨが低下し始めた時には、稀水酸化カリウムでｐＨを約６に保持した。ユウロピウム塩全てを添加し終えた後、ｐＨが約６．４に落ち着いた時、水酸化カリウムの添加を終了させた。次いで、溶液を凍結乾燥させた。次に、得られた固体を水中に吸収させ、濾過によってＥｕ（ＯＨ）$_3$を除去し、再び凍結乾燥して、綿状白色固体を生成した。

【００８８】

実施例１３

Ｅｕ－ＱＣｌ（ＣＴＰＨ）の調製

【００８９】

１－［２－（メチレン）－６－クロロキノリニル－４，７，１０－トリ（メチレンホスホン酸）－１，４，７，１０－テトラアザシクロドデカン（６）（５４ｍｇ，０．１ミリモル）を最初に脱イオン水（１ｍＬ）中に溶解させて、ｐＨ＝１．３の水溶液を生成した。次いで、塩化ユウロピウム六水和物（３７ｍｇ，０．１ミリモル）を水（１ｍＬ）中に溶解させ、連続的に撹拌しながらこの配位子溶液に一度に添加した（ｐＨ＝１．４）。次いで、ｐＨ＝５．５が持続するまで、水酸化ナトリウム（０．１Ｎ）を５０μＬずつ添加した。逆相ＨＰＬＣ（メタノール／水（８０：２０）で溶離）によって錯形成を監視した。次に、０．２μｍのフィルターを通してこの溶液を濾過し、凍結乾燥させて、錯体を綿状白色固体として生成した。これは、ＵＶランプによる励起時にブリリアント・グリーンの発光を示した。錯形成はＨＰＬＣによって評価し、収量は定量的であった。

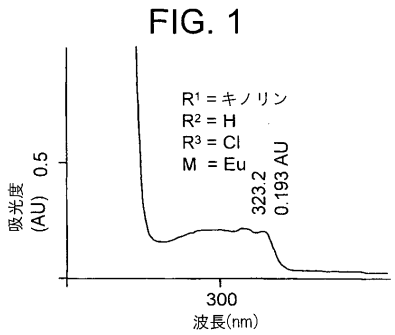
【００９０】

図１に示したような吸収スペクトルが得られた。

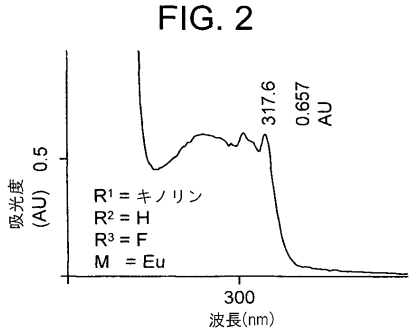
【００９１】
実施例１４
Ｅｕ－ＱＦ（ＣＴＰＨ）の調製
【００９２】
Ｎ－（６－フルオロ－２－キノリルメチル）－Ｎ’，Ｎ’’，Ｎ’’’－トリス（メチレンホスホン酸ブチルエステル）－１，４，７，１０－テトラアザシクロドデカンのカリウム塩（３００ｍｇ，３．３４×10^{-4}モル）を蒸留水１００ｍＬ中に溶解させた。最初は約１０．５であったこの溶液のｐＨを次に、稀塩酸を用いて６．５に調整した。塩化ユウロピウム六水和物（１２３ｍｇ，３．３４×10^{-4}モル）を蒸留水５０ｍＬ中に溶解させ、撹拌しながらブチル半エステル溶液中に添加した。ｐＨが低下し始めた時には水酸化カリウム希薄溶液でｐＨを約６に保持した。ユウロピウム塩を全て添加し終えた後、ｐＨが約６．４に落ち着いた時に、水酸化カリウムの添加を終了させた。次いで、この溶液を凍結乾燥させ、クロロホルム中に再溶解させ、セライトを通して濾過した。次に、得られた濾液を濃縮して、ガラス状固体を生成した。固体を次に水中に吸収させ、ミクロフィルターで濾過することによって$Eu(OH)_3$を除去し、凍結乾燥して、綿状白色固体を生成した。図２に示したような吸収スペクトルが得られた。
【００９３】
画像化
実施例１５
ハムスター頬モデルにおける画像化
【００９４】
巨視的腫瘍が見られるまで、ジメチルベンゾアントラセン（ＤＭＢＡ）の鉱油中０．５％溶液をＳｙｒｉａｎハムスターの右頬袋内に1週間に３回、局所的に適用することによって、頬の悪性病変を誘発した。目に見える腫瘍の誘発には一貫して６～１０週間要した。悪性でない病変を有する損傷のある頬袋は、ラウリル硫酸ナトリム（ＳＬＳ）を４日に１回局所的に適用することによって作成した。炎症性組織は４日以内に発現した。盲検試験において、病理学者は全病変の微細構造を評価した。
【００９５】
実施例１０からのキレート（Ｅｕ－ＱＭ（ＣＴＰＥ））を、５％エタノール溶液に０．５ｍＭの濃度で溶解させた。１．０～１．５ｍＬのキレート溶液を、局所適用によって導入して、頬袋上に１０分間溜めさせた。１０分間のインキュベーション期間後に、組織を５％エタノール溶液で洗浄し、次いで水洗し、それから最後にキューーチップできれいに拭い、検出される螢光が組織内部からであって、表面からではないことを保証した。
【００９６】
キレートの励起は、３１０ｎｍを照射することによって達成したが、発光は、ＣＣＤの前に６００ｎｍ（ＦＷＨＭ＝８０ｍｎ）フィルターを配置することによって記録した。８００スピードフィルム及び３５ｍｍカメラを用い、発光フィルターの助けを借りずに約０．５秒の露光時間でカラー写真を得た。図３は、ハムスター頬袋へのキレート剤の局所適用の結果を示す。
【００９７】
これらの結果は、これらのキレート剤が、動物において肉眼で見られるものとして異常を検出するのに使用できることを示している。
【００９８】
本明細書及び実施例は単なる代表例とみなし、本発明の真の範囲及び精神は添付した特許請求の範囲によってのみ示されるものとする。
【図面の簡単な説明】
【００９９】
【図１】式（ＩＩ）（式中、R^1はキノリルであり、R^2はＨであり、R^3はＣｌである）のユウロピウムキレートに関する吸収スペクトルである。
【図２】式（ＩＩ）（式中、R^1はキノリルであり、R^2はＨであり、R^3はフルオロであ

る）のユウロピウムキレートに関する吸収スペクトルである。
【図３】式（ＩＩ）（式中、R^1はキノリルであり、R^2はエチルであり、R^3はメチルである）のユウロピウムキレートを含むハムスターの頬袋の写真である。

【図１】



【図２】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
1 May 2003 (01.05.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/035655 A1

(51) International Patent Classification⁷: C07F 9/6524, 9/6558, 9/6561, A61K 49/00

(21) International Application Number: PCT/US02/34242

(22) International Filing Date: 22 October 2002 (22.10.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/355,684 22 October 2001 (22.10.2001) US

(71) Applicants: **TEXAS TECH UNIVERSITY** [US/US]; P.O. Box 42007, Lubbock, TX 79409-2007 (US). **DOW GLOBAL TECHNOLOGIES INC.** [US/US]; Washington Street, 1790 Building, Midland, MI 48674 (US).

(72) Inventors: **KIEFER, Garry, E.**; 114 Juniper Street, Lake Jackson, TX 77566 (US). **BORNHOP, Darryl, J.**; 6209 Louisville Drive, Lubbock, TX 79413 (US).

(74) Agent: **JOZWIAK, Elisabeth, T.**; The Dow Chemical Company, Intellectual Property, P.O. Box 1967, Midland, MI 48641-1967 (US).

(81) Designated States *(national)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(regional)*: ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
with international search report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 03/035655 A1

(54) Title: TISSUE SPECIFIC FLUORESCENT CHELATES

(57) Abstract: Fluorescent chelates of lanthanide, terbium, europium and dysprosium with tetraazamacrocyclic compounds are discussed which can be used as fluorescent in vitro or in vivo diagnostic agents. These chelates are tissue specific imaging agents for soft tissue cancers.

TISSUE SPECIFIC FLUORESCENT CHELATES

This invention concerns visual, tissue specific lanthanide, terbium, europium or dysprosium chelates that can be used as visual contrast enhancement agents or diagnostic agents.

Fluorescence imaging is found at the heart of numerous chemical and biomedical analysis schemes. Many of these schemes are based on the introduction of a fluorescent species as a marker, stain, dye or indicator [J-M. Devoisselle et al., Optical Engineering 32(2), 239 (1993); R. P. Haugland and A. Minta, "Design and Application of Indicator Dyes," Noninvasive Techniques in Cell Biol., ed. B. H. Satir, Chap. 1, p 1, (Wiley-Liss, New York, NY, 1990); D. J. Gross, "Quantitative Single Cell Fluorescence Imaging of Indicator Dyes," Noninvasive Techniques in Cell Biol., ed. B. H. Satir, Chap. 2, p 21, (Wiley-Liss, New York, NY, 1990)].

Organic chelates derived from lanthanide ions have become increasingly important as sensitive fluorescent markers for time resolved fluorometric assays [E. P. Diamandis, Clin. Biochem. 21, 139-150 (1988); Clin. Chim. Acta. 194, 19-50 (1990); Anal. Chem. 62, 11 49A-11 57A (1990); E. Soini and T. Lovgren, Crit. Rev. Anal. Chem. 18, 105-154 (1987)]. In particular, terbium and europium complexes are of significant value for these applications because of the efficient fluorescent emission in the visible region (E. P. Diamandis, US Patent 5,312,922). Both of these ions display a weak fluorescent emission in their non-complexed form, but when chelated with an appropriate organic ligand this visible emission is dramatically enhanced. Thus, the organic ligand acts as an antenna for absorbing ultraviolet radiation and

transferring this energy to the metal ion that then dissipates the absorbed energy in the form of visible light. The mechanistic details of this phenomenon are well studied and have been extensively documented [A. P. B. Sinha, Fluorescence and Laser Action in Rare Earth Chelates/Spectroscopy in Inorganic Chemistry Volume II, Academic Press, (1971)].

There are numerous chelates capable of long-lived fluorescence but not all of these complexes are suitable for biological applications, one reason being due to their instability in aqueous media [G. Kallistratos, Fluorescent Properties of Aromatic Complexes with Rare Earths and Other Elements of the IIIa-Group/Chemika Chronika. New Series, 11, 249-266 (1982)]. In fact, a large majority of fluorescent chelates are operative in non-aqueous conditions only. This is largely due to the instability of the complex in aqueous solutions resulting in non-complexed metal being present and quenching of the fluorescent pathway responsible for visible light emission. Ultimately, complexes of this type would not be sensitive markers at low concentrations and would present toxicity problems in vivo because of metal deposition in soft tissue.

In recent years chelating agents based upon tetraazamacrocyclic backbones have proven to be extremely valuable for generating aqueous stable lanthanide chelates. In particular, aminocarboxylate and aminophosphonate chelating agents derived from 1,4,7,10-tetraazacyclododecane have been shown to form highly stable lanthanide chelates [W. P. Cacheris, A. D. Sherry, Inorg. Chem. 26, 958-960 (1987); J. Simón, J. R. Garlich, D. A. Wilson, and K. McMillan, US Patent 4,976,950]. The superior nature of this class of chelates has made them useful for diagnostic

and therapeutic medical applications such as magnetic resonance imaging and bone marrow ablation. In addition, certain types of these macrocyclic chelating agents incorporating an aromatic moiety, such as the pyridine nucleus, have displayed very efficient fluorescent properties with terbium and europium (J. Kankare, J. Takalo, and P. Pasanen, US Patent 4,920,195). In this patent Kankare et al. demonstrate that a 14-menber macrocyclic europium chelate containing a pyridine nucleus can be conjugated to human IgG. The resulting conjugate thus contains a highly sensitive fluorescent tag (the chelate) which can be quantified by fluorescent immunoassay procedures.

Use of paramagnetic macrocyclic chelates based upon gadolinium (Gd) as contrast agents for magnetic resonance imaging has attracted considerable attention. The appeal of the lanthanide chelates is directly attributed to their kinetic and thermodynamic stability under the challenging aqueous environment encountered in the human body. Appropriate modifications can be made to this type of ligand that will cause pronounced fluorescence when lanthanides, such as terbium (Tb) and europium (Eu), are at the central core. Kim et al., Inorg. Chem. 34, 2233-43 (1995), have reported a recent study on some potential MRI contrast agents based upon macrocyclic pyridine containing ligands. In this study, the inner sphere water coordination was determined by measuring the fluorescent properties of the terbium and europium chelates.

The importance of macrocyclic lanthanide chelates for medical applications has continued to grow with the development of tissue specific agents. Thus far, applications have focused on chelation of

radioactive and paramagnetic metal ions for therapy and diagnosis (J. Simón, J. R. Garlich, D. A. Wilson, K. McMillan, US Patent 4,976,950; examples of gadolinium chelates for MRI are Prohance™ by Squibb and Dotarem™ by Guerbet). However, these chelates do not have any fluorescent properties.

The use of fluorescent chelates as visual tissue specific agents was discussed in US Patent 5,928,627 (G. E. Kiefer and D. J. Bornhop). These are macrocyclic lanthanide chelates that fluoresce when excited with UV light in the relatively short 260-280 nm wavelength range that can be used to detect colon cancer visually when illuminated with UV light.

Each year about 31,000 Americans develop oral cancer (4 percent of all cancers in males and 2 percent in females). [E. Baden, CA Cancer J. Clin. 37(1), 49-62(1987).] About half of those cancer persons are dead within 5 years from diagnosis, and of the survivors, many will have disfiguration and/or functional compromise. Thus early diagnosis is important as this could increase survival from 50 percent to 80 percent [S. Silverman, Jr. and M. Gorsky, J. Am. Dent. Assoc. 120(5), 495-499 (1990).] The incidence of second primary carconomas in the esophagus and upper aerodigestive tract has been estimated to be between 2 - 30 percent [D. P. Varbec, Trans. Pa. Acad. Ophthalmol. Otolaryngol. 32(2), 177-191 (1979); P. H. Marks and F. G. Schechter, Ann. Thorac. Surg. 33(4), 324-332 (1982); J. Gluckman, Laryngoscope 3, 90 (1983)]. Detection of these second primary tumors in the early stages would be advantageous.

The most widely used non-invasive method now used for early detection of oral cancer is gross

visualization under white-light illumination. This method can be problematic due to the low visual contrast for abnormal tissue, particularly for early detection of dysplastic and pre-malignant lesions where discrimination of such lesions from non-malignant lesions is very difficult. Spectroscopic techniques have been developed to try to improve early detection. Contrast agents are used to enhance the spectroscopic contrast between normal and diseased tissue. Most contrast agents require systemic administration to be effective, which causes exposure to phototoxicity for the tissues. A non-invasive administration of these contrast agents would be preferred.

Thus far, commercial applications of fluorescent chelates have been restricted primarily to the labeling of proteins and antibodies for immunoassays [E.P. Diamandis, Clinica Chimica Acta 194, 19-50 (1990); US Patent 5,312,922]. Products such as FIAgen™ (CyberFluor Inc., Toronto, Ontario, Canada) are available and utilize the europium chelate of 4,7-bis(chlorosulfonyl)-1,10-phenanthroline-2,9-dicarboxylic acid as the fluorescent label. Fluorescent labels of this type are extremely sensitive and can be detected in the subpicomolar range using time resolved fluorometry.

One of the most important features of diagnostic agents is that they must enhance the accuracy of assessing a disease state. Most frequently this involves delivering the diagnostic agent to a specific organ or soft tissue where a suspected abnormality may be present. Currently, the covalent attachment of a small molecule (that is, diagnostic fragment) to a large protein or antibody (referred to as "bifunctional") is receiving much attention as the

method of choice for achieving tissue specificity.

One such example of a bifunctional molecule is disclosed in Griffin, J.M.M. et al, "Simple, high yielding synthesis of trifunctional fluorescent lanthanide chelates", Tetrahedron Letters 42 (2001) pp. 1-3. Griffin discloses a lanthanide chelating ligand based on the cyclen (1,4,7,10-tetraazacyclododecane) nucleus which possesses a single carboxyl group for conjugation to a biologically active species such as an antibody. However, this method is inherently complex and expensive since it requires the use of a specialized antibody in order to achieve tissue specificity.

Therefore, it would be advantageous to use a small molecule diagnostic agent that would localize in a specific tissue of the body without the need for attachment to a delivery molecule such as an antibody. Furthermore, if a stable, fluorescent lanthanide chelate were to exhibit tissue specificity, it would be possible to visually determine the presence of the chelate by illuminating with the appropriate light source that minimized soft tissue damage. Potential applications would be fluorescent guided surgical procedures, in vivo imaging of bone or soft tissue cell growth or morphology, and examinations of the gastrointestinal tract.

Figure 1 is the absorption spectra for the europium chelate of Formula (II) where R^1 is quinolyl, R^2 is H, and R^3 is Cl.

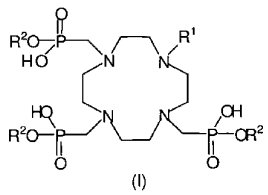
Figure 2 is the absorption spectra for the europium chelate of Formula (II) where R^1 is quinolyl, R^2 is H, and R^3 is fluoro.

Figure 3 is a photograph of a hamster cheek

pouch with the europium chelate of Formula (II), where R1 is quinolyl, R2 is ethyl, and R3 is methyl.

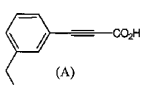
The present invention is directed toward novel tissue specific lanthanide, terbium, europium or dysprosium chelates that can be used as visual diagnostic agents. In particular, the preferred chelates are constructed from polyazamacrocyclic compounds of Formula (I) which contain a tetraazacyclododecane trimethylene phosphonic acid nucleus and a pendant ligating moiety which acts as an antenna.

The present invention is directed to novel compounds that are tetraazamacrocyclic compounds of the formula

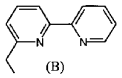


(I)

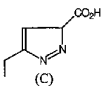
where: R^1 is



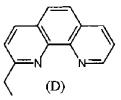
(A)



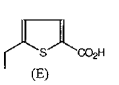
(B)



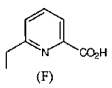
(C)



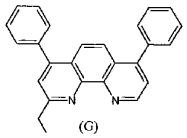
(D)

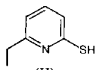


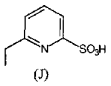
(E)

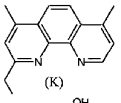


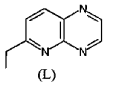
(F)

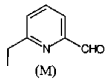

(G)

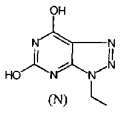

(H)

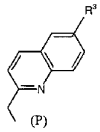

(J)


(K)


(L)


(M)


(N)


(P)

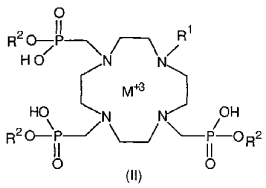
; , or

R^2 is methyl, ethyl, propyl, butyl or H; and

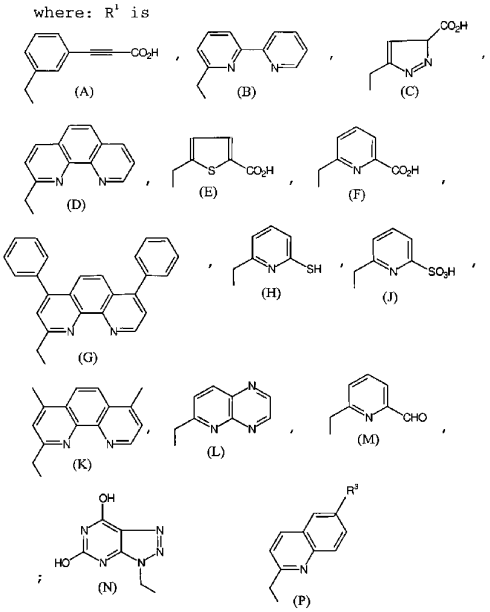
R^3 is F, C_1-C_4 alkyl, O(C_1-C_4 alkyl) or Cl; or

pharmaceutically acceptable salts thereof.

In another aspect, the present invention is directed to tetraazamacrocyclic chelate compounds of the formula


(II)

where: R^1 is



; or

R^2 is methyl, ethyl, propyl, butyl or H; and

R^3 is F, C_1-C_4 alkyl, O(C_1-C_4 alkyl) or Cl;

M is a metal ion of terbium (Tb), europium (Eu), lanthanide (La) or dysprosium (Dy); or

pharmaceutically-acceptable salts thereof.

Pharmaceutical solutions of the chelates are

used in preparing pharmaceutical formulations for topical application to the desired area. Advantageously, these solution are dilute compared with usual contrast agents. Thus these solutions are in the range of 0.001 M concentration irrespective of body weight, whereas with conventional pharmaceutical formulations such as MRI formulations, the concentrations of the solution are in the range of 0.5 M concentration in the vial for MRI solutions, with the dosage being based upon body weight. The formulations of the present invention are applied to the surface of the tissue such as by way of a rinse or a swab. For such surface applications, body weight is not a determining factor in the dosage.

Fluorescence images of the Golden Hamster cheek pouch tissues demonstrate the potential for using the lanthanide chelates to perform site-directed in vivo imaging.

The accuracy of early stage spectroscopic imaging in soft tissue can be enhanced significantly through the use of site directed molecules (contrast agents) which concentrate in a specific tissue.

The choice of metal used in the chelates of the present invention will depend upon the color desired for the fluorescent imaging and the ligand properties. The use of terbium (Tb) or europium (Eu) are preferred as the central metal ion to render a tissue specific fluorescent probe. Derivatives of this type would be valuable for visual assessment of tissue conditions such as early detection of oral and esophagus cancer and would not depend upon protein conjugation to reach their target. Furthermore, concentration of the active fluorescent material could conceivably be much higher than in the case of immunoassays making

detection much easier.

The present complexes have an excitation band of 300 to 340 nm, high quantum efficiency and millisecond relaxation lifetimes which allow signal collection after prompt tissue autofluorescence has subsided and allows data collection outside the range for normal tissue fluorescence. The present chelates permit use of a simplified and low cost imaging system, possess improved absorptivity, have larger quantum efficiencies, with longer UV wavelengths (that is, red-shifted excitation). In contrast to other fluorescent chelates that are readily quenched in aqueous media or are at a shorted wavelength that can cause soft tissue damage, the visual fluorescence does not degenerate in water, making them well suited for animal in vivo imaging applications and the red light wave length makes them less likely to cause soft tissue damage. Furthermore, chelates derived from this family of macrocyclic ligands are among the most thermodynamically and kinetically inert lanthanide complexes, a paramount consideration for biological studies where metal ion toxicity is of major importance.

The terms used in Formulas (I) and (II) and for this invention are further defined as follows. "C_1-C_4 alkyl", include both straight and branched chain alkyl groups. An "animal" includes a warm-blooded mammal, preferably a human being. As used herein, "complex" refers to a complex of the compound of the invention, for example, Formula (I), complexed with a metal ion, where at least one metal atom is chelated or sequestered.

As used herein, "pharmaceutically-acceptable salts" means any salt or mixtures of salts of a

compound of Formula (I) or (II) that is sufficiently non-toxic to be useful in diagnosis of animals, preferably mammals. Thus, the salts are useful in accordance with this invention. Representative of those salts formed by standard reactions from both organic and inorganic sources include, for example, sulfuric, hydrochloric, phosphoric, acetic, succinic, citric, lactic, maleic, fumaric, palmitic, cholic, palmoic, mucic, glutamic, gluconic acid, d-camphoric, glutaric, glycolic, phthalic, tartaric, formic, lauric, steric, salicylic, methanesulfonic, benzenesulfonic, sorbic, picric, benzoic, cinnamic acids and other suitable acids. Also included are salts formed by standard reactions from both organic and inorganic sources such as ammonium or 1-deoxy-1-(methylamino)-D-glucitol, alkali metal ions, alkaline earth metal ions, and other similar ions. Particularly preferred are the salts of the compounds of Formula (I) or (II) where the salt is potassium, sodium, or ammonium. Also included are mixtures of the above salts.

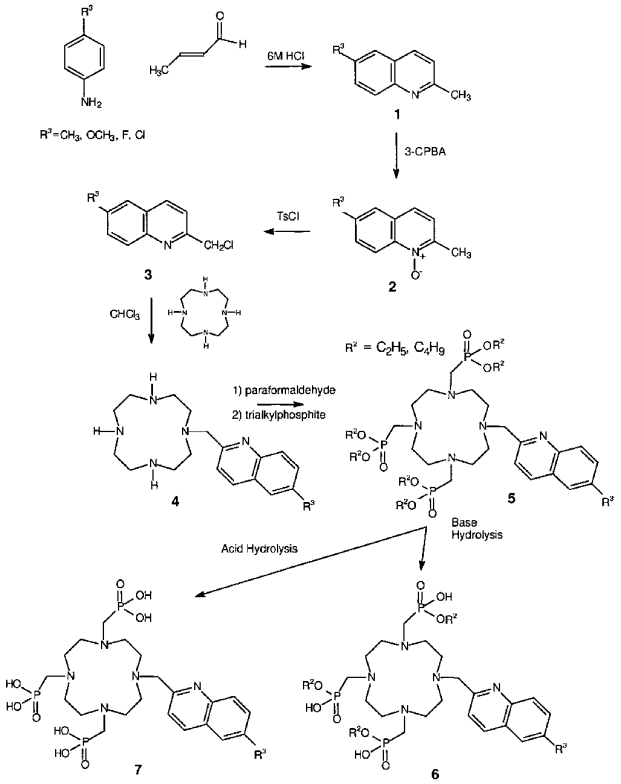
Of course, the free acid of the compounds of Formula (I) or (II) may be used, also the protonated form of the compounds, for example, when the nitrogen atoms are protonated, that is when the HCl salt is formed.

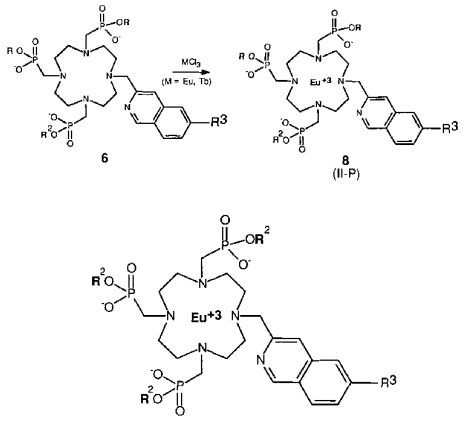
The complexes are prepared by methods well known in the art. Thus, for example, see Chelating Agents and Metal Chelates, Dwyer & Mellor, Academic Press (1964), Chapter 7. See also methods for making amino acids in Synthetic Production and Utilization of Amino Acids, (edited by Kameko, et al.) John Wiley & Sons (1974). An example of the preparation of a complex involves reacting a bicyclopolyazamacrocyclophosphonic acid with the metal ion under aqueous conditions at a

pH from 5 to 7. The complex formed results in a stable nuclide composition, for example, stable to the disassociation of the nuclide from the ligand.

The following Scheme 1 provides a detailed discussion of the preparation of the complexes of this invention.

Scheme 1


6M HCl
3-CPBA
TsCl
CHCl3
1) paraformaldehyde
2) trialkylphosphite
Acid Hydrolysis
Base Hydrolysis
R3=CH3, OCH3, F, Cl
R2 = C2H5, C4H9



Scheme 1 shows one embodiment of the synthesis for preparing the 12-membered tetraazamacrocyclic structure possessing one quinoline moiety. Further embodiments are detailed in the examples below. 4-Substituted-aniline is reacted with butyrlaldehyde in 6M hydrochloric acid to form 2-methyl-6-substituted-quinoline (1), according to the general procedure described in J. Org. Chem. 42, 911 (1977). This quinoline compound is then reacted with 3-CPBA (3-chloro-peroxybenzoic acid) to yield, at about 98 percent by weight, 2-methyl-6-substituted-quinolone N-oxide (2). Deprotection with tosyl chloride (or similar deprotection agent?) and simultaneous methyl-chlorination produces 2-chloromethyl-6-substituted-quinoline (3) (35-75 percent, which serves as a starting material). The last two steps are by the method of John Butera and Jehan Begli [J. Med. Chem. 34, 3212 (1991].

This starting quinoline (3) is then reacted with Cyclen (1,4,7,10-teraazacyclododecane) in chloroform at room temperature to form 1-[2-(7-substituted)-methylenequinolinyl]-1,4,7,10-tetraazacyclododecane (4).

The N-alkyl phosphonate esters are then synthesized by reacting the secondary amines of the macrocycle with a trialkyl phosphite (such as tributylphosphite or triethyl phosphite) and paraformaldehyde in tetrahydrofuran (THF). The resulting phosphonate ester 5 can then be hydrolyzed under basic conditions to yield the 1-[2-(6-substituted)methylenequinolinyl]-4,7,10-tris(methylenephosphonic acid n-alkyl ester)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane 6, or under acidic conditions to give the phosphonic acid derivative 7. These ligand systems then give the desired fluorescent chelate when complexed with the appropriate lanthanide ion such as Tb^{+3}, Eu^{+3}, or other metal ion such as La, Y, Sc, Sm, Gd, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, and Lu.

The complexes of the present invention are administered at a ligand to metal molar ratio of at least 1:1, preferably from 1:1 to 3:1, more preferably from 1:1 to 1.5:1. A large excess of ligand is undesirable since uncomplexed ligand may be toxic to the animal or may result in cardiac arrest or hypocalcemic convulsions.

"Complex" and "chelate" are used to mean a metal ion with a ligand of Formula (I), as shown in Formula (II).

$LaCl_3$, $TbCl_3$ and $EuCl_3$ as the hexahydrate were purchased from Aldrich Chemical.

The complexes of the present invention are preferably administered as oral solutions and are useful as diagnostic agents in the manner described. These

formulations may be in kit form such that the two components (that is, ligand and metal) are mixed at the appropriate time prior to use. Whether premixed or as a kit, the formulations usually require a pharmaceutically acceptable carrier.

Indictable compositions of the present invention may be either in suspension or solution form. In the preparation of suitable formulations it will be recognized that, in general, the water solubility of the salt is greater than the acid form. In solution form the complex (or when desired the separate components) is dissolved in a physiologically acceptable carrier. Such carriers comprise a suitable solvent, preservatives such as benzyl alcohol, if needed, and buffers. Useful solvents include, for example, water, aqueous alcohols, glycols, and phosphonate or carbonate esters. Such aqueous solutions contain no more than 50 percent of the organic solvent by volume.

Indictable suspensions are compositions of the present invention that require a liquid suspending medium, with or without adjuvants, as a carrier. The suspending medium can be, for example, aqueous polyvinylpyrrolidone, inert oils such as vegetable oils or highly refined mineral oils, or aqueous carboxymethylcellulose. Suitable physiologically acceptable adjuvants, if necessary to keep the complex in suspension, may be chosen from among thickeners such as carboxymethylcellulose, polyvinylpyrrolidone, gelatin, and the alginates. Many surfactants are also useful as suspending agents, for example, lecithin, alkylphenol, polyethylene oxide adducts, napthalenesulfonates, alkylbenzenesulfonates, and the polyoxyethylene sorbitan esters.

For applications where a tissue is rinsed with the

fluorescent chelate prior to examination, the chelate solution can vary in concentration depending upon the specific requirements. Typical concentrations for topical application are 10^{-2} to 10^{-7} M in an appropriate aqueous formulation. These concentrations are drastically lower than typical MRI contrast agents (0.5M) which are administered by IV injection at 0.1mM/Kg body weight.

The complexes and/or conjugates can be formulated for in vivo or in vitro uses. A preferred use of the formulated conjugates is the diagnosis of diseased states (for example, oral or esophagus cancer, colorectal, cervical) in animals, especially humans.

This invention is used with a physiologically acceptable carrier, excipient or vehicle therefore. The methods for preparing such formulations are well known. The formulations may be in the form of a suspension, indictable solution or other suitable formulations. Physiologically acceptable suspending media, with or without adjuvants, may be used.

An "effective amount" of the formulation is used for diagnosis. Advantageously, the formulation can be applied topically, which is non-invasive as compared to injectible formulations. The dose will vary depending on the disease and physical parameters of the animal, such as surface are of the tissue to be examined, the detectability of the image based on the equipment used, and the rate of chelate uptake in the diseased tissue. This latter point may be influenced by the chelate concentration and will be optimized based upon the disease type. In vivo diagnostics are also contemplated using formulations of this invention.

The complexes of Formula (II), formed with the

compounds of Formula (I) of this invention, are imaged using a method for detection of the emission, which combines microscopic interface with remote imaging technology to allow in vivo images. Methods suitable for such imaging are described in U.S. Patent Nos. 5,928,627 and 5,507,287.

The chelates of the present invention are well suited to topical applications on exposed tissue such as for example, the oral cavity, skin, and cervical tissue. For these type of applications the chelates can be excited using a simple focused UV light source

While not wishing to be bound by theory, it is believed that the advantageous results of the present invention are obtained because common to all chelates of this invention, the cation is positioned at an apical position above the 12-membered macrocycle and held in place through an ionic interaction with a phosphonic acid ligating group. It is this unique combination of functionalized nitrogen positions and ligating groups within the macrocyclic framework that enables chemical modifications leading to tissue selectivity.

The fluorescence of lanthanide salts such as La, Tb, Eu, and Dy in aqueous solution is very weak because the ions do not efficiently absorb the necessary energy. However, the fluorescence of these ions can be dramatically enhanced when the metal is complexed with an appropriate organic ligand.

In these unique complexes, the ligand of Formula (I) absorbs UV radiation and is excited from the ground state (S_0) to an excited state (S_1). As the ligand begins to return to its initial ground state, some of the energy is transferred from the triplet state of the ligand to an appropriate 4f energy level of the

lanthanide ion. When receiving energy from the triplet state of the ligand, the ion comes to the resonance state and can undergo a radiative transition resulting in the characteristic line emission of the metal ion (ion fluorescence). In these chelate structures the ligand essentially acts as an antenna for absorbing energy which is transferred to the metal ion and re-emitted in the form of visible light. It is also advantageous to have a ligand which absorbs energy at a significantly different wavelength than what is emitted by the metal ion to minimize interference (Stoke's shift).

There have been numerous fluorescent chelates reported. A great majority of these chelates are operative in anhydrous media only because fluorescence is quenched by water. The chelates of the present invention are far superior for biological applications because of their ability to form stable, fluorescent chelates in an aqueous environment. The unique positioning of the pyridine functionality, as either part of the macrocyclic ring or as a pendant group, enables efficient energy transfer to the metal ion and also augments overall chelate stability.

The invention will be further clarified by a consideration of the following examples, which are intended to be purely exemplary of the present invention.

Examples

For the following examples, numbers in parenthesis appearing after a chemical name refer to a structure number depicted below the corresponding structures in Scheme 1.

GENERAL EXPERIMENTAL

NMR Data was obtained on a Bruker Spectrometer operating at 250 MHz. Samples were prepared in either CDC_3 or D_2O with dioxane. All reported chemical shifts are reported relative to TMS (tetramethyl silane) or 1,4-dioxane as an external reference.

Absorption spectra for the ligands and chelates were obtained on a Varian/Cary 1, ultraviolet/visible spectrophotometer.

All chemicals were purchased from the Aldrich Chemical Company and used without further purification.

All parts and percentages are by weight unless otherwise specified.

ACRONYM TERMINOLOGY FOR CHELATES

Table A sets forth the acronyms which will be used in the following examples to represent chelants having the pendant groups listed. For all of the chelants listed in Table A, R^1 is quinoline (P in Formulas (I) and (II)).

Table A

Example	R2	R3	Chelate	Acronym
10	C_2H_5	CH_3	Europium-QuinolylMethyl(CyclicTriPhosphonateEthylester)	Eu-QM(CTPE)
11	C_4H_9	CH_3	Europium-QuinolylMethyl(CyclicTriPhosphonateButylester)	Eu-QM(CTPB)
12	H	CH_3	Europium-QuinolylMethyl(CyclicTriPhosphonic acid)	Eu-QM(CTPH)
13	H	Cl	Europium-QuinolylMethyl(CyclicTriPhosphonic acid)	Eu-QCl(CTPH)
14	H	F	Europium-QuinolylMethyl(CyclicTriPhosphonic acid)	Eu-QF(CTPH)

Starting Materials

Examples 1-3 describe the preparation of the 6-methyl substituted quinoline pendant group. The 6-chloro, 6-methoxy, and 6-flouro analogs are prepared in a similar manner by substituting the appropriate 6-chloro, 6-methoxy, or 6-flouro aniline in place of paratoluidine in scheme 1. Subsequent ligand and chelate synthesis for these other derivatives is identical to the following example.

Example 1: Synthesis of 2, 6-Dimethylquinaldine (1, R^3=methyl)

Paratoluidine (10g, 0.0933mol) was dissolved in 100mL of 6 M HCl and heated to 90°C with vigorous stirring. Crotonaldehyde (6.62g, 0.0945mol) was added dropwise to the mixture over a period of 6 hours, after

which the reaction was allowed to stir with heat an additional 2 hours. The completed reaction was allowed to cool to room temperature. $ZnCl_2$ (12.3g, 0.0933mol) was then added to the solution, which was stirred vigorously for 30min. The solution was then cooled to 0°C and stirred an additional 15 minutes. The precipitate was then vacuum filtered and washed with chilled 3 M HCl. The precipitate was then transferred to a beaker, stirred with isopropanol for 30 minutes, filtered, washed with additional isopropanol, and then finally with chilled ether. The solid was then transferred to a beaker to which 100 mL water was added and then chilled to 0°C while stirring. 30 mL of NH_4OH(aq) was added to the solution and allowed to stir 10 minutes. The resulting mixture was extracted with dichloromethane several times. The combined dichloromethane layers were dried using $MgSO_4$ and evaporated to afford 7.2g (49 percent yield) of a dark yellow solid. The solid was recrystallized in hexanes to produce a yellow solid. H^1 NMR ($CDCl_3$): δ 2.50 (s, 3H), 2.70 (s, 3H), 7.23-7.45 (m, 3H), 7.94-7.99 (m, 2H).

Example 2: Synthesis of 2, 6-Dimethylquinaldine N-oxide (2, R^3=methyl)

To a stirring solution of 2,6-Dimethylquinaldine (1) (5g, 0.0318mol) in 1,2 dichloroethane (130ml) was added 3-CPBA (3-chloro-peroxybenzoic acid) (7.43g of 72 percent activity, 0.0310mol). The reaction was then heated to 40°C for 24 hours. The completed reaction mixture was allowed to cool to room temperature, concentrated, and 10 percent K_2CO_3 and a minimal amount of ethyl acetate was to produce a two phase mixture. A precipitate then formed in both layers and was filtered, washed with water to remove traces of K_2CO_3 and dried to afford 4.67g (85 percent). H^1 NMR ($CDCl_3$): δ 2.52 (s, 3H), 2.66 (s, 3H), 7.28-7.56 (m, 4H), 8.70-8.79 (m, 1H).

Example 3: Synthesis of 2-(Chloromethyl)-6-methylquinoline (3, R^1=methyl)

To a stirring solution of p-toluenesulfonyl chloride (6.19g, 0.0325 mol) in dichloroethane (75mL) was added 2,6 dimethylquinaldine N-oxide (2) (5g, 0.0289mol) under N_2. The reaction mixture was then heated to 100°C for 24 hours, cooled, concentrated and extracted with 10 percent K_2CO_3 and ethyl acetate. The organic layer was dried with $MgSO_4$, concentrated and purified on a small silica flash column (2:1 dichloromethane: hexanes). The resulting yellow solid was then recrystallized in hexanes to afford 3.31g (60 percent) of a white solid. H^1 NMR ($CDCl_3$): δ 2.50 (s, 3H) 4.80 (s, 2H), 7.40-7.50 (m, 2H), 7.58-7.61 (d, 1H), 8.02-8.99 (m, 1H), 8.11-8.14 (d, 1H).

Ligand Synthesis

Example 4: Synthesis of N-(6-Methyl-2-quinolylmethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane (4, R^1=quinolyl, R^3=methyl)

To a stirring solution of cyclen (3.52g, 0.0204mol) in chloroform (525mL) was added 2-(Chloromethyl)-6-methylquinoline (3) (2g, 0.0104mol). The reaction was then allowed to stir until completion as determined by TLC, concentrated and purified on silica using a gradient elution system starting with 50:1 $CHCl_3$:MeOH; 150:4:1 $CHCl_3$:MeOH:NH_4OH; 100:4:1; 50:4:1; and finally with 20:4:1 to afford 2.54g (75 percent) of a pale yellow oil. H^1 NMR ($CDCl_3$): δ 2.35-3.15 (m, 22H), 3.87 (s, 2H), 7.33-7.42 (m, 2H), 7.58-7.62 (d, 1H), 7.94-8.07 (m, 2H).

Example 5: Synthesis of N-(6-fluoro-2-quinolylmethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane (4, R^1=quinolyl, R^3=F)

To a stirring solution of cyclen (3.52g, 0.0204mol) in chloroform (525mL) was added 2-(Chloromethyl)-6-fluoroquinoline (2g, 0.0102mol). The reaction was then allowed to stir until completion as determined by TLC, concentrated and purified on silica using a gradient elution system starting with 50:1 $CHCl_3$:MeOH; 150:4:1 $CHCl_3$:MeOH:NH_4OH; repeated at 100:4:1 $CHCl_3$:MeOH:NH_4OH; repeated again at 50:4:1 $CHCl_3$:MeOH:NH_4OH; and finally with 20:4:1 $CHCl_3$:MeOH:NH_4OH to afford 2.54g (75 percent) of a pale yellow oil that solidified on standing to an off-white solid. H^1 NMR ($CDCl_3$): δ 2.35-3.15 (m, 19H), 3.87 (s, 2H), 7.33-7.42 (m, 2H), 7.58-7.62 (d, 1H), 7.94-8.07 (m, 2H).

Example 6: Synthesis of N-(6-methyl-2-quinolylmethyl)-N', N'', N'''-tris(methylene phosphonic acid)-1,4,7,10 tetraazacyclododecane (7, R^1=quinolyl, R^2=H, R^3=methyl)

To a stirring solution of N-(6-methyl-2-quinolylmethyl)-1,4,7,10 tetraazacyclododecane (4) (1g, 0.00305mol) in dry THF (50mL) under N_2 was added paraformaldehyde (0.276g, 0.00918mol). The reaction was allowed to stir for 3 hours at room temperature. Tributylphosphite (2.30g, 0.00918mol) was then added to the mixture slowly and allowed to stir until the solution turned completely clear. The completed reaction mixture was concentrated and dried under high vacuum for 24 hours to afford a pale yellow oil. The resulting oil was dissolved in 6 M HCl (50mL) and heated with stirring to a gentle reflux for 4 days. The solution was allowed to cool and excess HCl was removed by azeotropic distillation with water to afford a pale yellow solid. The product was then further purified if necessary by recrystallization with anhydrous isopropyl

alcohol to afford 2.17g (90 percent) of a white solid. The compound was isolated in its fully protonated form. H^1 NMR (D_2O): δ 2.45-3.80 (br m, 25H), 4.07 (s, 2H), 7.67-7.74 (m, 2H), 7.87-7.91 (d, 1H), 8.18-35 (qr 1H), 8.79-8.84 (d, 1H).

Example 7: Synthesis of N-(6-methyl-2-quinolylmethyl)-N', N'', N'''-tris(methylene phosphonic acid butyl ester)-1,4,7,10 tetraazacyclododecane (6, R^1=quinolyl, R^2= C_4H_9, R^3=methyl)

To a stirring solution of N-(6-methyl-2-quinolylmethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane (4) (1g, 0.00305mol) in dry THF (50mL) under N_2 was added paraformaldehyde (0.276g, 0.00918mol). The reaction was allowed to stir for 3 hours at room temperature. Tributyl phosphite (2.30g, 0.00918mol) was then added to the mixture and allowed to stir until the solution turned completely clear. The completed reaction mixture was concentrated and dried under high vacuum for 24 hours to afford a pale yellow oil. The oil was then refluxed for four days with 27 equivalents of KOH dissolved in 20mL of H_2O with enough dioxane to achieve solubility. The resulting mixture volume was then reduced under vacuum to produce a thick oil. The oil was then washed with a series of increasing chloroform concentration methanol/chloroform solutions with filtration and removal of solvent. The resulting oil was then dissolved in a minimal amount of chloroform and acetonitrile was then added until the solution became cloudy. The mixture was allowed to stand to precipitate the pure product, which was then filtered, dissolved in water, and lypholized to produce 0.541g (20 percent) of a slightly yellow solid. H^1 NMR (D_2O): δ 0.75-0.85 (m, 9H), 1.18-1.45 (m, 6H), 1.48-1.55 (m, 6H), 1.91-3.10 (br m, 19H), 3.65-3.82 (br , 12H), 4.10-4.21 (br, 2H), 7.32-

7.41 (m, 1H), 7.50-7.61 (br, 1H), 7.80-7.88 (d, 1H), 7.92-8.01 (m, 1H), 8.20-8.31 (d, 1H).

Example 8: Synthesis of N-(6-methyl-2quinolylmethyl)-N', N'', N'''-tris(methylene phosphonic acid ethyl ester)-1,4,7,10 tetraazacyclododecane (6, R^1=quinolyl, R^2=C_2H_5, R^3=methyl)

To a stirring solution of N-(6-methyl-2-quinolylmethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane (4) (1g, 0.00305mol) in dry THF (50mL) under N_2 was added paraformaldehyde (0..276g, 0.00918mol). The reaction was allowed to stir for 3 hours at room temperature. Triethyl phosphite (1.524g, 0.00918mol) was then added to the mixture and allowed to stir until the solution turned completely clear. The completed reaction mixture was concentrated and dried under high vacuum for 24 hours to afford a pale yellow oil. The oil was then refluxed for four days with 27 equivalents of KOH dissolved in 20mL of H_2O with enough dioxane to achieve solubility. The resulting mixture volume was then reduced under vacuum to produce a thick oil. The oil was then washed with a series of increasing chloroform concentration methanol/chloroform solutions with filtration and removal of solvent. The resulting oil was then dissolved in a minimal amount of chloroform and acetonitrile was then added until the solution became cloudy. The mixture was allowed to stand to precipitate the pure product which was then filtered, dissolved in water, and lypholized to produce 0.520g (21 percent) of a slightly yellow, solid. H^1 NMR (D_2O): δ 0.87 (t, 6H), 1.07 (t, 3H), 2.45 (s, 3H), 2.49-3.09 (br m, 25H), 3.47 (p, 4H), 3.76 (p, 2H), 3.89 (s, 2H), 7.55 (m, 3H), 7.76 (d, 1H), 8.15 (d, 1H).

Example 9: Synthesis of N-(6-fluoro-2-quinolylmethyl)-N', N'', N'''-tris(methylene phosphonic acid)-1,4,7,10 tetraazacyclododecane (7, R^1=quinolyl (II-P), R^2=F)

To a stirring solution of N-(6-fluoro-2-quinolylmethyl)-1,4,7,10 tetraazacyclododecane (1g, 0.00302mol) in dry THF (50mL) under N_2 was added paraformaldehyde (0.298g, 0.00942mol). The reaction was allowed to stir for 3 hours at room temperature. Tributylphosphite (2.48g, 0.00942mol) was then added to the mixture slowly and allowed to stir until the solution turned completely clear. The completed reaction mixture was concentrated and dried under high vacuum for 24 hours to afford a pale yellow oil. The resulting oil was dissolved in 6 M HCl (50mL) and heated with stirring to a gentle reflux for 4 days. The solution was allowed to cool and excess HCL was removed by azeotropic distillation with water to afford a pale yellow solid. The product was then further purified if necessary by recrystallization with anhydrous isopropyl alcohol to afford 2.17g (90 percent) of a white solid. The compound was isolated in its fully protonated form. H^1 NMR (D_2O): δ 2.45-3.80 (br m, 22H), 4.07 (s, 2H), 7.67-7.74 (m, 2H), 7.87-7.91 (d, 1H), 8.18-35 (qr 1H), 8.79-8.84 (d, 1H).

Chelate Synthesis

Examples 10 and 11: Preparation of Eu-QM(CTPE) and Eu-QM(CTPB)

The potassium salt of N-(6-methyl-2-quinolylmethyl)-N', N'', N'''-tris(methylene phosphonic acid butyl (R^2=n-butyl) or ethyl (R^2=ethyl) ester)-1,4,7,10 tetraazacyclododecane (6) (300mg) was dissolved in 100mL of distilled water. The pH of the solution, which was around 10.5 to start, was then adjusted to 6.5

using dilute hydrochloric acid. Europium chloride hexahydrate (1 equivalent) was dissolved in 50mL of distilled water and added to the ligand solution dropwise with stirring. As the pH began to drop, it was maintained around six with a dilute potassium hydroxide solution. Addition of potassium hydroxide was terminated after all the europium salt had been added and when the pH had settled around 6.4. The solution was then lypholized, redissolved in chloroform and filtered through celite. The resulting filtrate was then concentrated producing a glassy solid. The solid was then taken up in water and filtered through a microfilter to remove $Eu(OH)_3$ and lipholized to produce a floculant white solid.

Example 12: Preparation of Eu-QM(CTPH)

The hydrochloride salt of N-(6-methyl-2-quinolylmethyl)-N', N'', N'''-tris(methylene phosphonic acid)-1,4,7,10 tetraazacyclododecane (7)(300mg) was dissolved in 100mL of distilled water. The pH of the solution, which was around 4.5 to start, was then adjusted to 6.5 using dilute potassium hydroxide. Europium chloride hexahydrate (1 equivalent) was dissolved in 50mL of distilled water and added to the ligand solution dropwise with stirring. As the pH began to drop, it was maintained around six with dilute potassium hydroxide. Addition of potassium hydroxide was terminated after all the europium salt had been added and when the pH had settled around 6.4. The solution was then lyophilized. The resulting solid was then taken up in water and filtered to remove $Eu(OH)_3$ and lyophilized again to produce a floculant white solid.

Example 13: Preparation of Eu-QCl(CTPH).

1-[2-(methylene)-6-chloroquinolinyl-4,7,10-tri(methylenephosphonic acid)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane (6) (54 mg, 0.1 mmol) was initially dissolved in deionized water (1 mL) to give an aqueous solution of pH = 1.3. Europium chloride hexahydrate (37 mg, 0.1 mmol) was then dissolved in water (1 mL) and added in one portion to the ligand solution with continuous stirring (pH = 1.4). Sodium hydroxide (0.1 N) was then added in 50 µL portions until a pH = 5.5 was sustained. Complexation was monitored by reverse phase HPLC eluting with methanol/water (80:20). The solution was then filtered through a 0.2 µm filter and freeze-dried to give the complex as a floculant white solid, which exhibited a brilliant green emission when excited with a UV lamp. The complexation was assessed by HPLC and the yield was quantitative.

Absorption spectra were generated as depicted in Figure 1.

Example 14: Preparation of Eu-QF(CTPH)

The potassium salt of N-(6-fluoro-2-quinolylmethyl)-N', N'', N'''-tris(methylene phosphonic acid butyl ester)-1,4,7,10 tetraazacyclododecane (300mg, $3.34X10^{-4}$mol) was dissolved in 100mL of distilled water. The pH of the solution, which was around 10.5 to start, was then adjusted to 6.5 using dilute hydrochloric acid. Europium chloride hexahydrate (123mg, $3.34X10^{-4}$mol) was dissolved in 50mL of distilled water and added to the butyl half ester solution dropwise with stirring. As the pH began to drop, it was maintained around six with a dilute potassium hydroxide solution. Addition of potassium hydroxide was terminated after all the europium salt had been added and when the pH had settled

around 6.4. The solution was then lypholized, redissolved in chloroform and filtered through celite. The resulting filtrate was then concentrated producing a glassy solid. The solid was then taken up in water and filtered through a microfilter to remove $Eu(OH)_3$ and lyophilized to produce a floculant white solid. Absorption spectra were generated as depicted in Figure 2.

Imaging

Example 15: Imaging in the hamster cheek model

Malignant lesions in the Syrian hamster cheek were induced by applying topically a 0.5 percent solution of dimethylbenzanthracene (DMBA) in mineral oil inside the right cheek pouch three times weekly until macroscopic tumors were seen. Induction of visible tumors consistently takes 6-10 weeks. Traumatized cheek pouches with non-malignant lesions were prepared by applying topically sodium lauryl sulphate (SLS) daily for four days. Inflamed tissue develops within four days. In a blind study, a pathologist assessed the histology of all lesions.

The chelate from Example 10 (Eu-QM(CTPE)) was dissolved in a 5 percent ethanol solution with a concentration of 0.5mM. Between 1.0 and 1.5 mL of the chelate solution was introduced by topical application and allowed to pool on the cheek pouch for a period of 10 minutes. After the 10 minute incubation period the tissue was washed with a 5 percent ethanol solution followed by washing with water and then finally wiped clean with a cue-tip to insure that the fluorescence detected was from within the tissue and not on the surface.

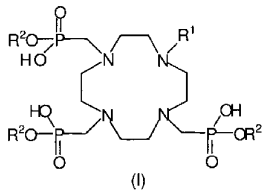
Excitation of the chelate was achieved by illuminating with 310nm while emission was recorded by placing a 600nm (FWHM = 80mn) filter in front of the CCD. Color photographs were obtained by using 800 speed film and a 35mm camera with an exposure time of approximately 0.5sec without the aid of an emission filter. Figure 3 illustrates the results of the topical application of the chelant to the Hamster cheek pouch.

These results show that these chelants can be used to detect abnormalities as seen in animals.

It is intended that the specification and examples be considered as exemplary only, with the true scope and spirit of the invention being indicated by the following claims.

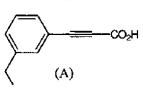
WHAT IS CLAIMED IS:

1. Tetraazamacrocyclic compounds of the formula

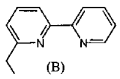


(I)

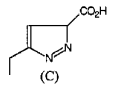
where: R^1 is



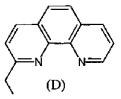
(A)



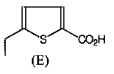
(B)



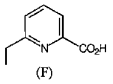
(C)



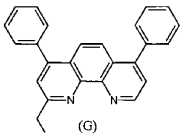
(D)



(E)



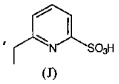
(F)



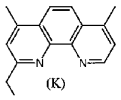
(G)



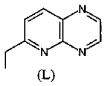
(H)



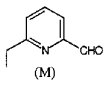
(J)



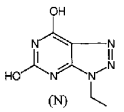
(K)



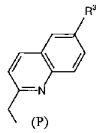
(L)



(M)



(N)



(P)

, or

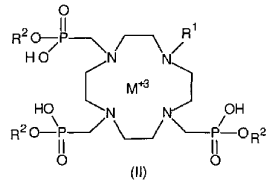
;

R^2 is methyl, ethyl, propyl, butyl or H; and

R^3 is F, Cl-C4 alkyl, O(C_1-C_4 alkyl) or Cl; or

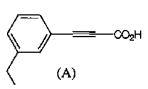
pharmaceutically acceptable salts thereof.

2. Tetraazamacrocyclic chelate compounds of the formula

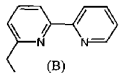


(II)

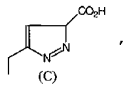
where: R^1 is



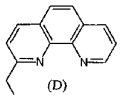
(A)



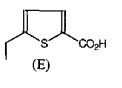
(B)



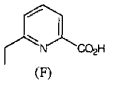
(C)



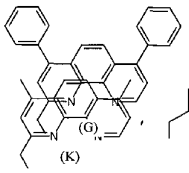
(D)



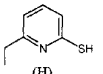
(E)



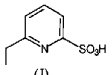
(F)



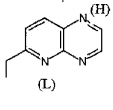
(G)



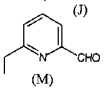
(H)



(J)

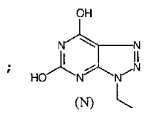


(L)



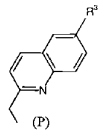
(M)

(K)



(N)

;



(P)

, or

R^2 is methyl, ethyl, propyl, butyl or H; and

R^3 is F, C1-C4 alkyl, O(C_1-C_4 alkyl) or Cl;

M is a metal ion of terbium (Tb), europium (Eu), lanthanide (La) or dysprosium (Dy); or

pharmaceutically-acceptable salts thereof.

3. Terbium 1-[2-(6-methoxy)methylenequinolinyl]-4,7,10-tri(methylene phosphonic acid)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane.

4. Europium 1-[2-(6-methoxy)methylenequinolinyl]-4,7,10-tri(methylene phosphonic acid)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane.

5. Europium 1-[2-(6-chloro)methylenequinolinyl]-4,7,10-tri(methylene phosphonic acid)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane.

6. Terbium 1-[2-(6-chloro)methylene-quinolinyl]-4,7,10-tri(methylene phosphonic acid)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane.

7. Europium 1-[2-(6-fluoro)methylene-quinolinyl]-4,7,10-tri(methylene phosphonic acid)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane.

8. Terbium 1-[2-(6-fluoro)methylene-quinolinyl]-4,7,10-tri(methylene phosphonic acid)-1,4,7,10-

tetraazacyclododecane

9. A pharmaceutical formulation which comprises a compound of Claim 1 with a pharmaceutically-acceptable carrier.

10. The formulation of Claim 9 where the amount of chelate in a solution for administration is from 0.1 mM to 5 mM.

11. A method for the diagnosis of a disease state in an animal which comprises administering to said animal an effective amount of the formulation of Claim 9, and obtaining an image.

12. The method of Claim 11 where the formulated chelate is administered as an injectable solution or as a wash solution.

13. The method of Claim 11 wherein the dose of the chelate administered topically is in solution form from 0.1 mM to 5 mM.

14. A method for the imaging an animal which comprises administering to said animal an effective amount of the formulation of Claim 9, and obtaining an image.

15. The method of Claim 12 where the image is obtained using an endoscopic fluorescence imaging microscope.

16. The method of Claim 14 or 15 where the image is obtained using an UV light source.

17. The method of Claim 13 or 14 where the quantitative amount of the complex of Claim 1 in the formulation is determined in the tissue imaged in vivo.

18. The method of Claim 11 wherein the disease state is oral cancer or esophagus cancer.

19. A method for the in vitro immunoassay or DNA hybridization of a tissue sample which comprises placing the sample on a medium, adding an effective amount of the compound of Claim 1, and followed by reading the results.

20. A process for preparing a complex of Formula (II) as claimed in Claim 2 which comprises reacting the compound with the metal ion halide in aqueous solution.

21. The method of Claim 11 wherein the UV wavelength used for detection of the chelate of Claim 2 for the disease state is from 300-340 nm.

FIG. 1

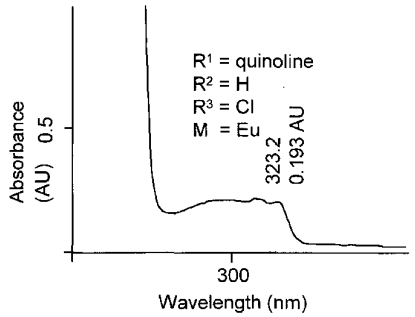

R1 = quinoline
R2 = H
R3 = Cl
M = Eu
323.2
0.193 AU
Absorbance
(AU) 0.5
300
Wavelength (nm)

FIG. 2

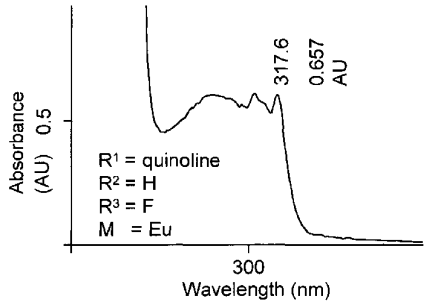

317.6
0.657
AU
Absorbance
(AU) 0.5
R1 = quinoline
R2 = H
R3 = F
M = Eu
300
Wavelength (nm)

FIG. 3



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat Application No
PCT/US 02/34242

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C07F9/6524 C07F9/6558 C07F9/6561 A61K49/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C07F A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
CHEM ABS Data, EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 94 26275 A (THE DOW CHEMICAL CO.) 24 November 1994 (1994-11-24) the whole document ---	1-21
Y	WO 94 26753 A (THE DOW CHEMICAL CO.) 24 November 1994 (1994-11-24) the whole document ---	1-21
Y	GRIFFIN J M M ET AL: "Simple, high yielding synthesis of trifunctional fluorescent lanthanide chelates" TETRAHEDRON LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 42, no. 23, 4 June 2001 (2001-06-04), pages 3823-3825, XP004249097 ISSN: 0040-4039 cited in the application the whole document --- -/--	1-21

[X] Further documents are listed in the continuation of box C. [X] Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
22 January 2003	31/01/2003

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Beslier, L

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internal Application No
PCT/US 02/34242

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 97 40055 A (THE DOW CHEMICAL CO.) 30 October 1997 (1997-10-30) the whole document	1-21

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 02/34242

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. [X] Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 11-18 are directed to a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

2. [ ] Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:

3. [ ] Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. [ ] As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. [ ] As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. [ ] As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. [ ] No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

[ ] No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No PCT/US 02/34242

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9426275 A	24-11-1994	US 5462725 A	31-10-1995
		AT 227297 T	15-11-2002
		AU 678583 B2	05-06-1997
		AU 6944794 A	12-12-1994
		BG 100192 A	31-12-1996
		CA 2162174 A1	24-11-1994
		CN 1125905 A	03-07-1996
		CZ 9502895 A3	15-01-1997
		DE 69431660 D1	12-12-2002
		EP 0711300 A1	15-05-1996
		FI 955319 A	22-12-1995
		HU 74565 A2	28-01-1997
		JP 8510245 T	29-10-1996
		LV 11430 A	20-08-1996
		LV 11430 B	20-04-1997
		NO 954440 A	05-01-1996
		PL 311643 A1	04-03-1996
		SG 46458 A1	20-02-1998
		WO 9426275 A1	24-11-1994
WO 9426753 A	24-11-1994	US 5714604 A	03-02-1998
		AP 543 A	09-10-1996
		AT 172978 T	15-11-1998
		AU 682190 B2	25-09-1997
		AU 6908694 A	12-12-1994
		BG 62775 B1	31-07-2000
		BG 100193 A	31-12-1996
		CN 1125949 A ,B	03-07-1996
		CZ 9502890 A3	13-03-1996
		DE 69414382 D1	10-12-1998
		DK 698029 T3	19-07-1999
		EE 3159 B1	15-02-1999
		EG 20296 A	31-10-1998
		EP 0698029 A1	28-02-1996
		ES 2123137 T3	01-01-1999
		FI 955281 A	20-12-1995
		HK 1014537 A1	19-05-2000
		HU 73142 A2	28-06-1996
		JP 8510249 T	29-10-1996
		LT 1925 A ,B	31-01-1995
		LV 10867 A ,B	20-10-1995
		NO 954439 A	05-01-1996
		PL 311651 A1	04-03-1996
		RO 115883 B1	28-07-2000
		RU 2135507 C1	27-08-1999
		WO 9426753 A1	24-11-1994
		ZA 9403158 A	06-11-1995
WO 9740055 A	30-10-1997	AU 719002 B2	04-05-2000
		AU 2660697 A	12-11-1997
		CA 2251924 A1	30-10-1997
		EP 0898574 A1	03-03-1999
		KR 2000010533 A	15-02-2000
		NO 984840 A	16-12-1998
		WO 9740055 A1	30-10-1997
		US 5928627 A	27-07-1999
		TW 422841 B	21-02-2001

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,YU,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100077517
弁理士 石田 敬
(74)代理人 100087413
弁理士 古賀 哲次
(74)代理人 100082898
弁理士 西山 雅也
(72)発明者 キーファー，ギャリー イー.
アメリカ合衆国，テキサス ７７５６６，レイク ジャクソン，ジュニパー ストリート １１４
(72)発明者 ボーンホップ，ダリル ジェイ.
アメリカ合衆国，テキサス ７９４１３，ラボック，ルイスビル ドライブ ６２０９

Ｆターム(参考) 4C061 AA02 AA08 CC06 HH51 JJ20
4C085 HH01 JJ02 JJ03 KA27 KB12 KB56 LL18
4H048 AA01 AA03 AB20 VA11 VA12 VA20 VA32 VA45 VA70 VB10
4H050 AA01 AA03 AB20