



(51) МПК

C01B 31/00 (2006.01)*A61K 49/06* (2006.01)*B82B 3/00* (2006.01)*C01F 17/00* (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2008142608/15, 27.10.2008

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
27.10.2008

(45) Опубликовано: 10.08.2010 Бюл. № 22

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: CHUNYING CHEN et al., Multihydroxylated
[Gd@C₈₂(OH)₂₂]_n Nanoparticles: Antineoplastic
Activity of High Efficiency and Low Toxicity,
Nano Letters, 2005, 5 (10), p.2050-2057. JP 2001-
114713 A, 24.04.2001. CN 101062421 A,
31.10.2007. CN 1743264 A, 08.03.2006. YUE
CHENG et al. Study of multihydroxylated
processes of (см. прод.)

Адрес для переписки:

188300, Ленинградская обл., Гатчина, Орлова
Роща, Петербургский институт ядерной
физики им. Б.П. Константинова РАН

(72) Автор(ы):

Грушко Юлий Сергеевич (RU),
Седов Виктор Петрович (RU),
Козлов Валерий Степанович (RU),
Цирлина Евгения Владимировна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Петербургский институт ядерной физики им.
Б.П. Константинова РАН (RU)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ MRI-КОНТРАСТИРУЮЩЕГО АГЕНТА

(57) Реферат:

Изобретение может быть использовано для
получения высокоэффективных
магниторелаксационных систем, а именно
водорастворимых эндометаллофуллеренов,
применяемых в ЯМР-томографии.
Фуллереносодержащую сажу предварительно
экстрагируют растворителем из класса
ароматических углеводов или
сероуглеродом. Затем селективной экстракцией
диметилформамидом получают твердую
высокообогащенную по металлофуллеренам

гадолиния смесь пустых фуллеренов и
металлофуллеренов гадолиния Gd@C₈₂. Смесь
подвергают гидроксигированию перекисью
водорода в один этап с получением
Gd@C₈₂(OH)_x, где x больше или равен 20,
представляющего собой водорастворимую
гидроксигированную смесь пустых фуллеренов
и металлофуллеренов гадолиния Gd@C₈₂(OH)_x.
Полученный целевой продукт выделяют
осаждением избытком спирта с последующим
центрифугированием и отделяют от избытка
перекиси водорода промывкой спиртом. 2 ил.

(56) (продолжение):

Gd@C₈₂ by ICP-MASS, Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry,
2007, vol.272, №3, p.537-540. CHUN-YING SHU et al., Synthesis and
characterization of a new water-soluble endohedral metallofullerene
for MRI contrast agents, Carbon, 2006, 44, p.496-500. TATIANA DA
ROS, MAURIZIO PRATO, Medicinal chemistry with fullerenes and
fullerene derivatives, Chemical Communications, 1999, p.663-669.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.

C01B 31/00 (2006.01)*A61K 49/06* (2006.01)*B82B 3/00* (2006.01)*C01F 17/00* (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**(21), (22) Application: **2008142608/15, 27.10.2008**(24) Effective date for property rights:
27.10.2008(45) Date of publication: **10.08.2010 Bull. 22**

Mail address:

**188300, Leningradskaja obl., Gatchina, Orlova
Roshcha, Peterburgskij institut jadernoj fiziki
im. B.P. Konstantinova RAN**

(72) Inventor(s):

**Grushko Julij Sergeevich (RU),
Sedov Viktor Petrovich (RU),
Kozlov Valerij Stepanovich (RU),
Tsirlina Evgenija Vladimirovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Peterburgskij institut jadernoj fiziki im. B.P.
Konstantinova RAN (RU)**

(54) METHOD OF OBTAINING MRI-CONTRASTING AGENT

(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: invention can be used for obtaining highly efficient magnetic-relaxation systems, namely water-soluble endometallofullerenes, applied in NMR tomography. Fullerene-containing soot is preliminarily extracted with solvent from the class of aromatic hydrocarbons or with carbon bisulphide. After that by selective extraction with dimethylformamide, solid highly beneficiated in gadolinium memallofullerenes mixture of empty fullerenes and gadolinium metallofullerenes $Gd@C_{82}$ is obtained. Mixture is

subjected to hydroxylation with hydrogen peroxide in one step obtaining $Gd@C_{82}(OH)_x$, where x is greater or equal 20, representing water-soluble hydroxylated mixture of empty fullerenes and metallofullerenes of gadolinium $Gd@C_{82}(OH)_x$. Obtained target product is isolated by sedimentation with excess of alcohol with further centrifugation and separated from hydrogen peroxide by washing with alcohol.

EFFECT: elaboration of efficient method of obtaining highly efficient magnetic-relaxation systems.

2 dwg, 1 ex

Изобретение относится к химии фуллеренов, а именно к методам получения высокоэффективных магниторелаксационных систем для ЯМР-томографии на основе водорастворимых эндометаллофуллеренов.

Важнейшими материалами, улучшающими разрешение ЯМР изображения тканей, являются контрастирующие агенты, уменьшающие время релаксации протонов воды в исследуемой ткани.

В настоящее время для этих целей используются различные органические комплексы гадолиния (хелаты), например Gd - диэтилентриаминиэптаацетат (GD-ДТРА). Этот препарат коммерчески выпускается и используется для проведения ЯМР-томографии.

Однако его недостатком является токсичность, связанная с возможным появлением в организме свободного иона гадолиния.

В России магнито-контрастирующие препараты не производятся.

В настоящее время поиски ученых идут в направлении использования с этой целью эндометаллофуллеренов, обладающих способностью уменьшать время магнитной релаксации протонов воды и биологических жидкостей по сравнению с протонами тканей: [1] Патент JP 2001114713, A61K 49/00, G01N 30/00 (Gadolinium-Included Fullerol and its Use as Contrast Medium); [2] Патент US 20060088474, C07F 5/00 (Endohedral Metallofullerene Contrast Agent).

Преимуществом эндометаллофуллеренов является то, что инкапсулированный в углеродную оболочку фуллерена ион металла защищен от химической атаки и потому не проявляет токсичности, характерной для тяжелых металлов. Другим важным в перспективе свойством эндометаллофуллеренов является возможность присоединения к фуллереновой оболочке определенных функциональных групп, определяющих маршрут молекулы в организме и доставку ее в определенный орган/ткань при определенных методах администрирования.

В качестве аналога нами рассмотрен способ получения гидроксированного металлофуллерена гадолиния $Gd@C_{82}(OH)_2$, описанный в работе [3] (Chemistry Letters., Soc, 2005, 34, №9, 1264-1265). Способ относится к получению нового производного металлофуллерена, гидроксированного эндоэдрального Gd - металлофуллрена. $Gd@C_{82}(OH)_2$ был синтезирован реакцией раствора $Gd@C_{82}$ в ортодихлорбензоле с 30% перекисью водорода.

Полученный гидроксированный металлофуллерен не растворим в воде, поэтому не может быть использован в качестве контрастирующего агента.

Наиболее близким к заявляемому способу получения MRI-контрастирующего агента является способ, описанный в работе [4]: Nano Letters, 5 (10), 2050-2057, 2005 - прототип.

Способ заключается в следующем: MRI-контрастирующий агент готовится из $Gd@C_{82}$. Металлофуллерены были синтезированы методом электродугового разряда и экстрагированы из фуллереносодержащей сажи (ФСС) диметилформамидом (ДМФ) с использованием высокой температуры и высокого давления. Разделение и очистка $Gd@C_{82}$ была выполнена с помощью высокоэффективной жидкостной (ВЭЖХ) в сочетании с 5PBB- и затем Вискупрег колоннами. Степень очистки доводили до 99,5%. Далее проводили гидроксирование $Gd@C_{82}$.

Водорастворимый гадолиний-фуллеренол был синтезирован методом гидроксирования по щелочной реакции. Раствор $Gd@C_{82}$ в толуоле смешивают с водным раствором, содержащим 50% NaOH. Затем в реакционную систему добавляется несколько капель катализатора 40% ТВАН (тетрабутиламмоний

гидроксид). Смесь растворов перемешивается при комнатной температуре. Выпавший осадок коричневого цвета отделяется, к нему добавляется вода, после чего он перемешивается в течение ночи. Далее он промывается метиловым спиртом, который затем удаляется в ротаторном испарителе. Процедуру промывки повторяют несколько раз до полного удаления остатков ТВАН и NaOH. Окончательно коричневый осадок растворяют в деионизованной воде при постоянном перемешивании до того момента, как цвет раствора не станет прозрачным. Красновато-коричневым раствор подвергают хроматографической очистке на колонке Сефадксе G-25 при элюировании нейтрализованной водой. Оставшиеся следы катализатора и Na-ионов полностью удаляют в этом процессе. XPS-анализ дает формулу $Gd@C_{82}(OH)_{22}$.

К недостаткам этого способа относим сложную и трудоемкую процедуру хроматографического (ВЭЖХ) выделения $Gd@C_{82}$, сложность процедуры гидроксилирования металлофуллерена Gd щелочным методом и дальнейшую его очистку. Совокупность всех этих сложнейших процедур приводит к значительным потерям целевого продукта. Общие потери целевого продукта по литературным данным составляют порядка 50% [5] (Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, V.272, №3, июнь 2007, с.537-540). Поэтому вышеуказанные недостатки приводят к высокой себестоимости выделенного MRI-контрастирующего агента.

Задачей, решаемой в предлагаемом изобретении, является упрощение и удешевление способа получения MRI-контрастирующего агента при сохранении высоких контрастирующих характеристик и нетоксичности.

Технический результат - получение MRI-контрастирующего агента, имеющего хорошие контрастирующие характеристики, сравнимые со стандартными медицинскими заграничными препаратами.

Технический результат достигается тем, что в способе получения MRI-контрастирующего агента на основе $Gd@C_{82}(OH)_x$, где x больше или равен 20, представляющего собой водорастворимую гидроксилированную смесь пустых фуллеренов и металлофуллеренов гадолиния $Gd@C_{82}(OH)_x$, включающем стадии извлечения $Gd@C_{82}$ диметилформамидом из фуллереносодержащей сажи, его гидроксилирование и выделение целевого продукта, новым является то, что фуллереносодержащую сажу предварительно экстрагируют растворителем из класса ароматических углеводородов или сероуглеродом, затем селективной экстракцией диметилформамидом получают твердую высокообогащенную по металлофуллеренам гадолиния смесь пустых фуллеренов и металлофуллеренов гадолиния $Gd@C_{82}$, которую подвергают гидроксилированию перекисью водорода в один этап, и полученный целевой продукт выделяют осаждением избытком спирта с последующим центрифугированием и отделяют от избытка перекиси водорода промывкой спиртом.

Предлагаемая совокупность операций позволяет получить гидроксилированную смесь металлофуллеренов гадолиния $Gd@C_{82}(OH)_x$, пригодную, в том числе по чистоте, для применения в качестве MRI-контрастирующего агента.

Такая смесь обладает также практически полезными свойствами, характерными для MRI-контрастирующих агентов, а именно: способностью уменьшать время магнитной релаксации протонов воды и биологических жидкостей по сравнению с чистой водой, хорошей растворимостью в воде. Растворимость в воде и содержание активной компоненты (Gd) для полученных препаратов были не менее 5 мг/мл и 3 вес.% соответственно.

Кроме того, MRI-контрастирующий эффект полученного продукта в десятки раз выше, чем препаратов, используемых в медицинской практике (хелатные комплексы

гадолиния).

Присутствие пустых водорастворимых фуллеренов не приводят к эффектам токсичности [6] (Chem. Comm., 1999, 663-669).

Заявляемый способ отличается простотой и относительной дешевизной, т.к. исключает стадии малопроизводительной и высокочрезмерной ВЭЖХ при выделении $Gd@C_{82}$ и многоступенчатой очистки гидроксилированного целевого продукта.

На фиг.1 представлен график «интенсивность ЯМР-сигнала - время» для выделенных областей крысы, где: кривая 1 показывает изменение интенсивности сигнала в области печени; кривая 2 показывает изменение интенсивности сигнала - время в области сердца. Фиг.1 относится к стандартному ЯМР-контрастному медицинскому препарату «Гадовист» (хелатный комплекс гадолиния). Введено 200 микромоля препарата «Гадовист».

На фиг.2 представлено действие заявляемого MRI-контрастирующего агента. Показан график интенсивность ЯМР-сигнала - время» для выделенных областей крысы, где: кривая 1 показывает изменение интенсивности сигнала в области печени; кривая 2 показывает изменение интенсивности сигнала - время в области сердца. Введено 4,2 микромоля заявляемого MRI-контрастирующего агента. Таким образом, использованная доза заявляемого препарата была в 47 раз меньше, чем препарата «Гадовист».

Заявляемый способ включает следующие операции.

Из фуллереносодержащей сажи (ФСС) получают смесь пустых фуллеренов и металлофуллеренов гадолиния, высокообогащенную металлофуллеренами гадолиния. Для этого ФСС смешивают сначала с растворителем из класса ароматических углеводородов, например орто-ксилолом, или сероуглеродом. Затем проводят селективную экстракцию диметилформамидом (ДМФ), обладающим большим электрическим дипольным моментом. В результате этого получают смесь пустых фуллеренов, обогащенную металлофуллереном $Gd - (Gd@C_{82})$. Затем полученную твердую вышеуказанную смесь фуллеренов гидроксилируют путем воздействия на нее перекиси водорода. Гидроксилирование проводят в один этап. Полученный целевой продукт выделяют осаждением избытком спирта и отделяют от избытка перекиси водорода.

Пример конкретной реализации

ФСС, полученная электродуговым способом, имеет состав: C_{60} - 70-85%; C_{70} - 28-15%; высшие фуллерены - 1,5-2%; металлофуллерены - 1,5-0,2%. Необходимое количество ФСС смешивается с компактирующей жидкостью (орто-ксилолом) в соотношении 1,5/1,0 г/мл соответственно. Добавляется пористое стекло фракции 0,25 мм в объемном соотношении 30:70 соответственно. Все тщательно перемешивается до получения компактной механической смеси равномерно распределенных компонентов гранулированной сажи и сферических частиц пористого стекла. Такое выполнение этой операции позволяет избежать образования комков, увеличивает поверхность соприкосновения сажи с растворителем при проведении дальнейших операций. Полученная смесь загружается в фильтровальный стаканчик аппарата Сокслета, заливается орто-ксилолом в соотношении 30 мл/г сажи и проводится экстракция фуллеренов в течение 5 часов. Происходит удаление основной части пустых фуллеренов. Затем орто-ксилол заменяется на диметилформамид (ДМФ). Проводится селективная экстракция диметилформамидом ФСС с целью получения высокообогащенной по Gd смеси. В результате этого получают смесь пустых

фуллеренов и металлофуллеренов гадолиния ($Gd@C_{82}$) в соотношении 40:60 соответственно (смесь высокообогащенная по металлофуллеренам Gd). Далее проводят фильтрацию экстракта фуллеренов в ДМФ через фильтр зеленая лента и PTFE фильтр 0,22 мкм. Затем осуществляют перевод этого экстракта в твердую фазу на роторном испарителе при пониженном давлении.

Операцию гидроксирования проводят в один этап действием перекиси водорода на твердую вышеуказанную смесь фуллеренов. Фуллереносодержащий препарат (смесь пустых фуллеренов и металлофуллеренов гадолиния, высокообогащенная по металлофуллеренам Gd), выделенный из диметилформамидного экстракта фуллеренов перемешивается в концентрированной H_2O_2 (соотношение смесь/ H_2O_2 , мг/мл = $(20 \div 25)/1$) при температуре $\geq 60^\circ C$ в течение ~20 часов (до образования практически прозрачного окрашенного раствора).

Примерно через 1÷1,5 часа суспензия начинает превращаться в мутную смесь темно-коричневого цвета. Наблюдается газовыделение и пенообразование. По мере протекания процесса смесь становится все более прозрачной. Прозрачный темно-коричневый раствор охлаждается до комнатной температуры (при непрерывном перемешивании) и выливается в изопропиловый спирт, взятый в 20-кратном избытке по отношению к результирующему раствору. Образовавшаяся суспензия темно-коричневого цвета перемешивается на магнитной мешалке еще не менее 6 часов, а затем центрифугируется. Жидкий спиртовой раствор после центрифугирования - практически бесцветная жидкость, что свидетельствует о полноте извлечения целевого продукта.

Очистка целевого продукта: осадок коричневого цвета водорастворимых гидроксированных фуллеренов - промывается чистым спиртом от следов перекиси водорода и сушится под разрежением при температуре $40^\circ C$. Выход целевого продукта порядка 90% относительно сухого ДМФ экстракта. Степень очистки контролировалась диализом.

В заявляемом способе не требуется очень высокой степени очистки $Gd@C_{82}$ от пустых фуллеренов (в прототипе она доведена до 99,5%). Как мы указывали выше, методики очистки ВЭЖХ малопроизводительны, трудоемки и высокочастотны.

Заявляемый способ не требует применения ВЭЖХ, не требует сложных процедур щелочного гидроксирования, дальнейшей сложной очистки, связанной с большими потерями (до 50%) целевого продукта, дает хороший выход нетоксичного MRJ-контрастирующего вещества.

Оценка контрастирующих свойств полученного $Gd@C_{82}(OH)_x$ в смеси с пустыми фуллеренами, где $x >$ или $=20$, проводилась методом ЯМР-томографии на крысах (фиг.2). ЯМР-томография проводилась в ФГУ «НИИ Онкологии им. Н.Н.Петрова Росмедтехнологий» С.-Петербург. Для сравнения мы привели данные для препарата «Гадовист» (фиг.1).

Приводим данные по пересчету.

Используемая доза заявляемого препарата в 47 раз меньше, чем доза стандартного медицинского препарата «Гадовист».

Рассмотрим область ROI 1 - печень.

Сигнал для «Гадовиста» в пересчете на одинаковую дозу с нашим препаратом составит 7,3 МР-единиц (350:47,6). Сигнал от заявляемого MRI-агента составил 215 МР-единиц. Т.е. отношение сигнала от заявляемого MRI-агента к сигналу от препарата «Гадовист» (коэффициент усиления контраста) в расчете на равные дозы составляет 29,24 (215:7,3).

Пересчет для области ROI 2 - сердце.

Сигнал для заявляемого MRI-агента равен 215 МР-ед. Сигнал для «Гадовиста» равен 700 МР-ед. Доза его в 47 раз больше. Следовательно, расчетный коэффициент усиления контраста для заявляемого MRI-агента в 14,6 раз выше ($215:700 \times 47,6$).

Таким образом, полученный магнитоконтрастный агент в $15 \div 30$ раз эффективнее стандартного медицинского препарата «Гадовист».

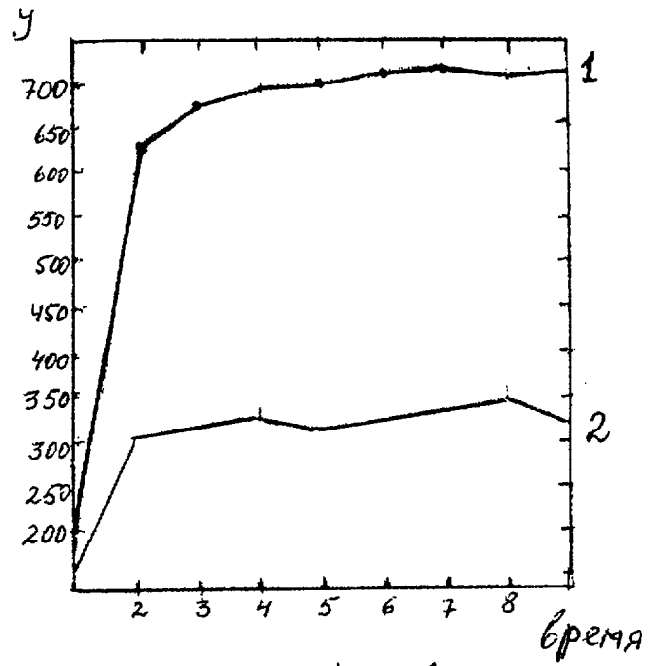
В дополнительных материалах мы даем параметрическую карту крысы и данные непосредственно с ЯМР-томографа.

Литература

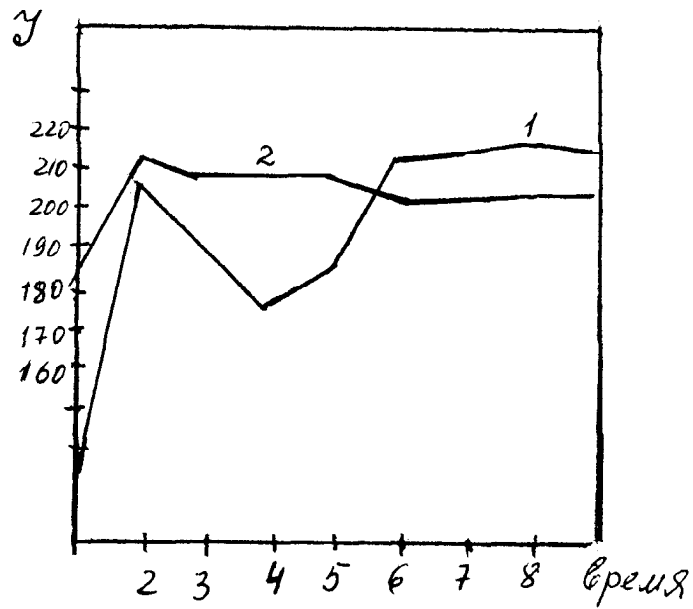
1. Патент JP 2001114713, A61K 49/00, G01N 30/00.
2. Патент US 20060088474, C07F 5/00.
3. Chemistry Letters. Soc, 2005, 34, №9, 1264-1265.
4. Nano Letters, 5 (10), 2050-2057, 2005 - прототип.
5. Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, V.272, №3, июнь 2007, с.537-540.
6. Chem. Comm., 1999, 663-669.

Формула изобретения

Способ получения MRI-контрастирующего агента на основе $Gd@C_{82}(OH)_x$, где x больше или равен 20, представляющего собой водорастворимую гидроксированную смесь пустых фуллеренов и металлофуллеренов гадолиния $Gd@C_{82}(OH)_x$, включающий стадии извлечения $Gd@C_{82}$ диметилформамидом из фуллереносодержащей сажи, его гидроксирование и выделение целевого продукта, отличающийся тем, что фуллереносодержащую сажу предварительно экстрагируют растворителем из класса ароматических углеводородов или сероуглеродом, затем селективной экстракцией диметилформамидом получают твердую высокообогащенную по металлофуллеренам гадолиния смесь пустых фуллеренов и металлофуллеренов гадолиния $Gd@C_{82}$, которую подвергают гидроксированию перекисью водорода в один этап, и полученный целевой продукт выделяют осаждением избытком спирта с последующим центрифугированием и отделяют от избытка перекиси водорода промывкой спиртом.



Фиг. 1



Фиг. 2