

ELJÁRÁS PARAMÁGNESES FÉMEKKEL KELÁTKÉPZÉSRE ALKALMAS,
SPECIFIKUS SEJT-JELZŐHELYEKKEL REAGÁLÓ FAKTORRAL KAP-
CSOLHATÓ KONJUGÁTUMEGYSÉGEK ELŐÁLLÍTÁSÁRA

Sintetica S.A., Carouge, Svájc

A bejelentés napja: 1992. 07. 10.

Elsőbbsége: 1991. 07. 22. (91810589.1) Európa

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/EP92/01560

A nemzetközi közzététel száma: WO 93/01837

K I V O N A T

A találmány tárgya új eljárás adagolható vívőanyag-
molekulák területén alkalmazható vegyületek előállítására,
aminek célja paramágneses, mágneses rezonancia útján képki-
alakító (a továbbiakban röviden: MRI) kontraszterősítők,
felszabadítása kiválasztott (meghatározott) szervekben vagy
szövetekben.

A (III) általános képletű konjugátumegységekben

X¹ jelentése -CHO vagy -SH csoport;

Alk jelentése 1-4 szénatomos alkilénecsoport, amely adott
esetben -S- csoportot tartalmaz;

Z jelentése 1-4 szénatomos, adott esetben -COO- cso-
portot tartalmazó alkilénecsoport; és

legalább az egyik Y jelentése poli(alkilén-amino)-polikarbon-
sav kelátképző molekula (és a másik Y, amennyiben
jelen van, hidrogénatom lehet) szabad sav vagy para-
mágneses ionokkal alkotott komplex formájában;

n értéke 0-tól körülbelül 100-ig terjedő egész szám; és
M jelentése az -NH és Y közötti kötés, amely lehet egy amidkötés, amely magában foglalja az Y csoport -CO részét és a (III) képletű vegyület -NH részét; vagy lehet egy szerves, hídalkotó szubsztituens, amely az Y alkilén-szénatomjához kapcsolódik.

A (III) általános képletű konjugátumegységeket úgy állítják elő, hogy

- 1a) egy (I) általános képletű vegyületet - amelyben X jelentése -S- vagy -CHOH- csoport, és Alk, Z és n jelentése a fentebb meghatározott - az Y kelátképző (IIa) általános képletű acilező származékával - amelyben a karboxilcsoportoknak legalább egyike acilezésre alkalmas derivatizált formában, például intra- vagy intermolekuláris anhidrid, halogenid, reakcióképes amid vagy reakcióképes észter alakjában van - acileznek; vagy
- 1b) egy (I) általános képletű vegyületet reagáltatnak a poli(alkilén-amino)-polikarbonsav kelátképző (IIb) általános képletű származékával, amely egyik alkilén-szénatomon reakcióképes benzol-diazónium-, halogén-acetamido-fenil-, halogén-acetamido-benzil-, izocianato-fenil-, izotiocianato-fenil- vagy azo-imidát hídalkotó csoporttal szubsztituált; és
- 2) az így kapott (IV) általános képletű vegyület -XX- kötését hasítva egy (III) általános képletű vegyülethez jutnak.

A találmány szerinti eljárásra jellemző, hogy az (I) és (IV) általános képletekben R jelentése olyan immobilizáló

szilárd fázis, amelyhez az (I) és (IV) általános képletű molekulák többi része kovalensen kötődik közvetlenül vagy egy kötőcsoport (térközecsoport) útján, amelyet előzetesen építenek be a szilárd fázist regenerálják, és egy következő előállítási ciklusban ismételten felhasználják.

802/93

76601
A
KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY US 05- AG 1K 49/00
AG 1K 47/48

63344

Képviselő:

Danubia Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

Budapest

ELJÁRÁS PARAMÁGNESES FÉMEKKEL KELÁTKÉPZÉSRE ALKALMAS,
SPECIFIKUS SEJT-JELZŐHELYEKKEL REAGÁLÓ FAKTORRAL KAP-
CSOLHATÓ KONJUGÁTUMEGYSÉGEK ELŐÁLLÍTÁSÁRA

Sintetica S.A., Carouge, Svájc

Feltaláló:

PALACIOS Paul, Madrid, Spanyolország

A bejelentés napja: 1992. 07. 10.

Elsőbbsége: 1991. 07. 22. (91810589.1) Európa

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/EP92/01560

A nemzetközi közzététel száma: WO 93/01837

76760-6674 TEL

A találmány tárgya új eljárás adagolható vívőanyag-molekulák területén alkalmazható vegyületek előállítására. Ennek célja paramágneses, mágneses rezonancia útján képkialakító (a továbbiakban röviden: MRI) kontraszterősítők felszabadítása kiválasztott szervekben vagy szövetekben.

Ismertek olyan molekulakonjugátumok, amelyekben egy monoklonális vagy poliklonális antitest (citoszelektív irányító faktor) kovalensen kötődik egy paramágneses fémionokkal kapcsolódó aminopolikarbonsav kelátképzőt hordozó (szerkezeti) egységgel.

Igy például W. T. Anderson és munkatársai [Cancer Res. 45, 2154-2158 (1985)] közlik, hogy 1 mól antitest - antitest-hatásának és specificitásának megtartása mellett - 8 mólra terjedő mennyiségben képes dietilén-triamin-pentaecetsav (röviden: DTPA) megkötésére. A DTPA paramágneses fémekkel szemben erélyes kelátképző; ilyen fémek például a Gd, Fe, Cr és Ni, amelyek ezen az úton specifikus sejthelyekre célozhatók (irányíthatók), és a protonspin-relaxáció (T_1 és/vagy T_2) módosításával és a kép kontrasztosságának erősítésével az MRI útján elősegítik a kép láthatóságát (láthatóvá tételét).

A 90/14881 számú PCT közrebocsátási iratban leírják poliaminokarbonsav kelátképzők kapcsolását irányító fehérjékhez hídképző funkciós csoportok segítségével. Ilyen hídképző csoport például az izocianato-, izotiocianato-, bróm-acet-amido-, diazo-, N-hidroxiszukcinimid-észter-csoport, valamint az intermolekuláris vagy intramolekuláris anhidridek.

A kelátképzőnek az antitesthez viszonyított molaránya azonban túlságosan csekély volt a hatásos MRI kontrasztnöve-

léshez, s ezért további kutatásokat folytattak a kontrasztnövelés jobb hatékonysága (hatásfoka) érdekében. Így például W. George és H. Catherine WU a 90/01900 számú PCT közrebocsátási iratban olyan konjugátumokat ismertetnek, amelyekben egy ligandumot, például valamely glikoproteint - amelynek szabad terminális galaktózcsoportjai vannak az adott sejttípus felületén lévő egyedi receptorok felismerésére - kapcsolnak valamilyen kelátozószerszerhez, például DTPA-hoz vagy 1,4,7,10-tetraza-ciklododekán-N₄-tetraecetsavhoz (röviden: DOTA), amely alkalmas paramágneses fémek megkötésére, s így stabilis, nem-toxikus komplex képzésére. Szelektív proteinként aszialooroszomukoidot (röviden: AsOR) és DTPA-t alkalmaznak közelebbről le nem írt módon, s így esetenként olyan kelátot kapnak, amelyben a Gd AsOR-hez viszonyított aránya 5:1 és 15:1 között van. Találmányuk egy más kiviteli módja szerint polilizint (röviden: PL) úgy módosítanak, hogy a deszialilezett glikoprotein laktóz-termináljaival, majd ezt követően DTPA-val reagáltatják, s így egy aszia-PL-kelátképző konjugátumhoz jutnak. Kimutatták, hogy ezzel a konjugátummal elérhető 90 mól Gd kötődése a lizin 1 móljára vonatkoztatva. Ebben a közrebocsátási iratban azonban kísérleti részletek nem találhatók.

Y. Manabe és munkatársai [Biochim. and Biophys. Acta 883, 460-467 (1986)] ismertették DTPA-val kapcsolódó poli(L-lizin) előállítását olyan módon, hogy körülbelül 100 polimerizációs fokú (röviden: DP) poli(L-lizin)-t DTPA gyűrűs anhidridjével (röviden: caDTPA) reagáltattak, majd 2-piridil-diszulfid-csoportokat vezettek be a termékbe N-szukcinimidil-3-(2-piridil-ditio)-propionáttal (röviden: SPDP) végzett re-

akció útján, és az így kapott terméket tiolozott IgG-vel (immunglobulin G) kapcsolva kovalens tia-kötésű konjugátumot állítottak elő. E reakciósort az 1) reakcióvázlat szemlélteti.

Hasonló eljárást közölnek P. Shreve és munkatársai [Magnetic Resonance in Medicine 3, 336-340 (1986)].

P. F. Sieving és munkatársai [Bioconjugate Chem. 1, 65-71 (1990)] eljárást közöltek poliaminokarbonsav kelátképzők kapcsolására polilizin oldalláncban lévő terminális $-NH_2$ -csoportjaihoz, amelyet vegyes anhidridek útján végeztek. Ez utóbbit úgy kapták, hogy kelátokat (például DPTA vagy DOTA kelátokat) sóik alakjában szerves aminokkal, például trietil-aminnal vagy tetrametil-guanidinnel és izobutil-(klór-formiát)-tal (röviden: IBCF) kezeltek. A kelátképzőt hordozó polilizint ezt követően emberi szérumalbuminnal (röviden: HSA) kapcsolták a következőképpen: a polilizin oldalláncban lévő, nem reagált aminocsoportjait szukcinimidil-4-(N-maleinimido-metil)-ciklohexán-1-karboxiláttal (röviden: SMCC) reagáltatva malinimido-csoporttal aktivált maradékokat kaptak, míg a HSA egyes szabad aminocsoportjait 2-imido-tiolánnal aktiválták, s így legalább egy, reakcióképes alkil-tiol-csoport-hoz jutottak. Végül az így kapott HSA-tiolt a polilizinrel kapcsoló kelátképző maleinimido-terminálisainak a kettős kötésére addicionálták. Becslésük szerint az így kapott konjugátum az irányító fehérje 1 móljára számítva átlagosan körülbelül 70 kelátképző helyet tartalmazott.

A fentebb említett eljárások hátránya, hogy minden egyes lépésben a kapott közbenső termékek gondos kromatográfiás tisztítása szükséges; e műveletek hosszadalmasak, és

csekély hozamokat eredményeznek. A jelen találmány javított módszert tesz lehetővé egy (III) általános képletű konjugátumegység előállítására, amely paramágneses fémionokkal komplexképzésre alkalmas, és összekapcsolható olyan fehérjeirányító faktorokkal, amelyek specifikusan reagálnak kiválasztott sejtjelzőhelyekkel; ezen az úton olyan adagolható vegyületekhez jutunk, amelyek alkalmasak a paramágneses MRI kontrasztnövelő egységek magas arányban történő szelektív eljuttatására és felszabadítására előre meghatározott területeken, mind in vivo körülmények között, mind szövettenyészetekben.

Ez az eljárás - amint ezt az 1. igénypontban összegezzük - azon alapul, hogy immobilizáló fázist alkalmazunk a kiinduló anyagok és ezt követően a soron következő közbenső termékek megkötésére, ahogyan a szintézis előrehalad. Az utolsó lépésben a kívánt terméket az immobilizáló fázisról hasítási reakcióval szabadítjuk fel, amellyel egyszersmind reakcióképes végcsoportot alakítunk ki az irányító (célzó) faktorral történő kapcsoláshoz. Az immobilizáló fázis alkalmazásának előnye különösen a közbenső termékek elkülönítése során jelentkezik, mivel az elkülönítés egyszerű szűréssel vagy centrifugálással végezhető. A jelen találmány szerinti eljárás egy másik előnye, hogy a hasítási lépésben molekulánként csak egyetlen aktivált, terminális csoport szabadul fel, ezzel szemben a jelenleg ismert eljárásokban a megfelelő közbenső termékek gyakran több reakcióképes végcsoportot tartalmaznak, s ez az irányító faktorral végzett kapcsolás során térhálósodáshoz vezet. Egy további előny adódik különösen az (1a) lépés végrehajtása során, ha a választott acilező vegyület egynél több imino-di-

ecetsav-gyűrűt tartalmazó belső anhidrid, mivel a kettősen jelenlévő funkciós csoportok térhálósodáshoz vezetnek. Ha az (I) általános képletű vegyületeket szilárd fázison immobilizáltan alkalmazzuk, akkor többfunkciós anhidridekkel végzett acilezés során a térhálósodást sztérikus gátlás akadályozza.

A jelen találmány szerinti eljárásban az immobilizáló szilárd fázis - amelyet R betűszimbólummal jelölünk - valamilyen polimer gyanta lehet, amely megmaradó reakcióképes csoportokat hordoz a felületén; vagy lehet ásványi részecske (üvegből vagy kerámiai anyagból) amely egy vagy több lépést igénylő folyamatban az (I) általános képletű kiinduló komponens kialakítására megfelelő, beépített szubsztituenst tartalmaz. E célra alkalmazhatók például olyan gyanták, mint a poliakril-, polisztirol-, poliamid-, poliészter-, poliimid- és poliolefin gyanták. Ásványi részecskékként kerámiai anyagból álló porok vagy gyöngyök, például alumínium-oxidból, szilícium-dioxidból, rutilből vagy porózus üvegből álló porok vagy gyöngyök használhatók. Az ásványi részecskéket - előnyösen porózus üvegyöngyöket - úgy tehetjük reakcióképesé, hogy azokat reakcióképes végcsoportokat - például izocianato-, amino-, amido-, szubsztituált oxi-karbonil-, hidroxil- vagy tiolcsoportot - tartalmazó trialkoxi-szilánnal szilánozzuk. A találmány szerinti eljárás egyik előnyös megvalósítása szerint a gyöngyöket tio-alkil-szilánnal szilánozzuk [lásd H. Weetall: "Covalent Coupling Methods for Inorganic Support Materials" ("Szervetlen hordozóanyagokon alkalmazható kovalens kapcsolási módszerek") a következő helyen: Meth. Enzym. 44, 134 (1976)], majd a kapott terméket ciszteaminnal reagáltatjuk, s így olyan

immobilizált közbenső aminterméket kapunk, amely hasítható diszulfidkötést ($-XX- = S_2$) tartalmaz [lásd L. Field és munkatársai: J. Am. Chem. Soc. 83, 4414 (1961)]. Tiolozott gyanták, például a tioszefaróz, szintén megfelelő kiinduló anyagok.

Eljárhatunk úgy is, hogy az immobilizált amint a következőkben iniciátorként alkalmazzuk az aminosav-N-karbonil-anhidridek (röviden: NCA-k) telechelikus polimerizációjában, s így olyann (I) általános képletű kiinduló anyagot kapunk, amelyben n értéke a zérustól eltérő; e reakciókat az alábbiakban részletezzük. Megjegyezzük, hogy halogén-alkil-csoportokkal derivatizált poliolefinek bisz(amino-propil)-amin jelenlétében tiokarbamiddal szulfidálhatók (lásd Wardell: "The Chemistry of Thiol Groups" ("A tiolcsoportok kémiája"), I. rész, szerk. S. Patai, Wiley, New-York (1974)], s így szintén megfelelő kiinduló anyagokhoz juthatunk. Tio-metil-csoportot tartalmazó gyanták (Merrifield-gyanták) szintén elláthatók amino-alkil-ditia-szubsztituensekkel ugyanúgy ciszteaminnal végzett reakció útján, ditio-piridinnel végzett közbenső reakcióval vagy anélkül [H. Yahima és munkatársai: J. Am. Chem. Soc. 63, 2263 (1941)].

A 2) reakcióvázlatban szemléltetünk egy halogén-alkilezett gyantából kiinduló reakciósort.

A jelen találmány egy további megvalósítási módja szerint a szilárd fázist epoxi-propil-szilánnal reagáltatva beépített oxirángyűrűt tartalmazó termékekhez jutunk; ez a csoport egyes kereskedelmi forgalomban lévő poli(akril-amid)-gyantákban, például az Eupergit gyantákban (gyártója a Sigma Chemicals cég) jelen van. Az oxiráncsoportot tartalmazó immo-

bilizált fázist alkalmazzuk 1,2-diol-egységet tartalmazó közbenső termékek előállításához, tehát olyan (I) általános képletű vegyületek előállításához, amelyekben -XX- jelentése -CHOH-CHOH- csoport, a 3) reakcióvázlatban bemutatott szkéma szerint.

A (B) és (A) általános képletű vegyületek terminális aminocsoportját a következőkben alkalmazzuk a kelátképző molekulával végzendő közvetlen kapcsolásra szabad állapotban vagy a paramágneses fémionnal alkotott komplex formájában; e kapcsolást önmagában ismert módon végezzük például a bevezetőben leírt módon, különösen Liu Yuanfang és munkatársai módszerével [Pure and Applied Chem. 63, 427-463 (1991)]. Eljárhatunk úgy, hogy az amint a kelátképző valamilyen anhidridjével acilezzük (e célra például intramolekuláris anhidridet alkalmazhatunk, azaz a kelátképző olyan alakját, amely legalább egy imino-diecetsav-anhidrid-gyűrűt tartalmaz; vagy használhatunk e célra intermolekuláris anhidridet, mely két azonos vagy két különböző molekulából tevődik össze, amelyet a választott poli(alkilén-amino)-polikarbonsav kelátképző szerből állítunk elő. Heterogén intermolekuláris anhidridek előállításához reagensként előnyösen alkalmazható az izobutil-(klór-formiát) [lásd Bioconjugate Chem. 1, 65-71 (1990)].

Ezt követően a találmány szerinti eljárás (2) lépésében az immobilizáló fázisról a kelátképzőt lehasítjuk, s ezzel egyidőben a kelátképzőn olyan reakcióképes csoportot alakítunk ki, amely az irányító fehérjefaktorhoz való kapcsolásra alkalmas; e fehérjét a kapcsolás előtt adott esetben aktiválnunk kell.

A fenti (A) általános képletű vegyületek esetében a hasítást a vicinális diolok szelektív oxidációjára vagy peroxidálására általában használt módon végezhetjük; ennek során egy $\text{OHC-CH}_2\text{SCH}_2\text{-CH}_2\text{NH-MY}$ általános képletű reakcióképes aldehid szabadul fel, ahol M és Y jelentése az 1. igénypontban meghatározott.

A fenti (B) általános képletű vegyületek esetében a hasítást a diszulfid-kötésen a szokásos módszerekkel végezzük, például valamilyen merkaptán, így tio-etanol vagy ditio-treitol jelenlétében. Ebben az esetben egy $\text{HS-(CH}_2)_2\text{-NH-MY}$ általános képletű kelátképző molekula szabadul fel, amely a szokásos módon alkalmazható szulfiddal aktivált fehérje irányító faktor kapcsolásához (lásd a leírás bevezetésében idézett közleményeket). A hasítási reakció után az immobilizáló fázis például szűréssel vagy centrifugálással regenerálható, és egy következő előállítási ciklusban ismét felhasználható. Így az eljárás gazdaságossági szempontból kedvező. Ha az immobilizáló fázis egy aldehid- és szulfid-csoportot tartalmazó vegyülettel (lásd a fenti aldehidet) együtt szabadul fel, akkor más szintézisben felhasználható vagy a szokásos módszerekkel regenerálható, és a jelen találmány szerinti eljárás egy másik ciklusában ismét felhasználható.

A jelen találmány egyik különösen érdekes kiviteli módja szerint az (A) vagy (B) általános képletű aminok iniciátorokként alkalmazhatók aminosavanhidridek telechelikus polimerizációjában [E. J. Goethals: "Telechelic Polymers, Synthesis and Applications" ("Telechelikus polimerek szintézise és alkalmazása"), CRC Press, New-York (1989)]; ezen az

úton poliaminosavakhoz jutunk, tehát olyan vegyületekhez, amelyek polimer vázán számos, kelátképző molekula kapcsolására alkalmas kötőhely van. Ezzel az eljárással előnyösen növelhető a kapcsolás után kapott, irányított molekulákban kelát alakjában megkötött paramágneses ionok száma. A találmány egyes kiviteli módjai szerint a (B) általános képletű vegyületet az L-glutaminsav gamma-helyzetben védett származékai vagy az aszparaginsav megfelelő, béta helyzetben védett származékai aminosavanhidridjeinek a polimerizálására alkalmazzuk. Ez utóbbi esetekben védőcsoportként benzil-, fenacil-, piperonil- vagy p-metoxi-fenacil-csoportot alkalmazhatunk.

Az észtereket van Heeswijk módszerével [Synthesis, 744 (1982)], az aminosavanhidrideket foszgénnel (gázalakú foszgénnel vagy szilárd trifoszgénnel) végbemenő reakció útján állítjuk elő. Polimerizáció után az iniciátor amint terminálisan tartalmazó poliaminosavakról a szokásos módon eltávolítjuk a védőcsoportokat, e célra például brómhidrogénsavat vagy trifluor-ecetsavat (röviden: TFA) használhatunk, majd az így kapott, szabad karboxilcsoportot etiléndiaminnal (vagy valamilyen más alkiléndiaminnal) amidáljuk, s így az oldalláncban terminálisként primer amincsoportokat tartalmazó terméket kapunk. Ezekhez a terminális aminocsoportokhoz a kelátképző molekulákat a fentebb (A) vagy (B) általános képletű vegyületek esetére leírt módon kapcsoljuk, azaz vagy acilezés útján vagy úgy, hogy a kelátképző polialkilénamin-polikarbonsav molekula egyik alkilén-szénatomjából reakcióképes kötőhidat alakítunk ki, és ezt használjuk fel. Ezt követően az -XX- kötést a fentebb már ismertetett körülmények között hasítjuk, s így

szabad, aktivált kelátképző polimer szabadul fel, amely szabad karboxilcsoportokat tartalmazó vagy paramágneses fémvel komplexet alkotó karboxilcsoportokat tartalmazó formában kapcsolható az irányító faktorhoz.

Hasonló reakciókat végezhetünk az L-lizin aminosav-anhidridjének alkalmazásával, amidőn az epszilon-NH₂-csoportokat fluorenyl-oxi-karbonil- (röviden: PFL) vagy benzil-oxi-karbonil- (röviden: PBL) csoporttal védjük. Polimerizáció után a védőcsoportot dimetil-formamidban (röviden: DMF) piperidinnel vagy dioxánban oldott TFA és metánszulfonsav elegyével eltávolítjuk (lásd a példákat).

A fentebb leírtak szerint nyert telechelikus poliaminosavak számos terminális amint tartalmaznak oldalláncban, amelyekhez a kelátképző molekulák az előbbiekben már leírt módszerekkel kapcsolhatók. Így például az immobilizált (A) általános képletű vegyülettel iniciáljuk az L-lizin-aminosav-anhidrid polimerizációját, az így nyert, immobilizált polilizint reagáltathatjuk caDTPA-val, s így olyan poliaminosavhoz jutunk, amelynek polimerizációs foka megközelítőleg 50-110, és amelyben az oldalláncok jelentős hányada (akár 60-80%-a) kelátképző molekulával van kapcsolatban. Ezt követően - amint fentebb kifejtettük - oxidáció útján felszabadítjuk a polimer kelátképzőt, amely -CHO végcsoportot tartalmaz, és ez utóbbi útján kapcsolható az irányító faktorhoz; ez esetben nem szükséges a fehérje aktiválása a kapcsolási reakció előtt, és ez nyilvánvalóan a találmány lényeges előnye a technika jelenlegi állása szerint ismert eljárásokhoz képest. Irányító faktorokként igen sok fehérje alkalmazható: ilyenek például a monoklo-

nális és poliklonális antitestek, így a humán szérumalbumin (HSA), a specifikus és nonspecifikus Ig-k, alfa-2-makroglobulin, interleukin, epidermális növekedési faktor (EGF), a trombocitákból származó növekedési faktorok és általában a specifikus sejt-jelzőhelyeket felismerő fehérjék és glikoproteinek.

A találmányt az alábbi nem korlátozó jellegű példákban részletesen ismertetjük. (A kísérleti részben a fentebb már jelzett rövidítésekön kívül az AcOH ecetsavat jelent.)

Példák

A glutaminsav-aminosav-anhidrid-benzil-észtert H. Block módszerével állítottuk elő ["Ring Opening Polymerization" ("Gyűrűnyitással járó polimerizáció") 2, 23, szerk. K. C. Frish és S. L. Reegen, kiadó Marcel Dekker, New-York (1969)].

A glutaminsav-aminosavanhidrid-(gamma-fenacil)-észtert úgy kapjuk, hogy 8,6 g glutaminsav-észter és 250 ml tetrahidrofurán (röviden: THF) szuszpenziójába foszgént vezetünk, teljes oldódás után a kapott oldatot nitrogénnel öblítjük, majd bepároljuk, és a szilárd maradékot etil-acetát és hexán elegyből átkristályosítjuk. Színtelen, kristályos terméket kapunk.

A glutaminsav-aminosavanhidrid-(gamma-piperonil)-észtert úgy állítjuk elő, hogy 1 g észtert 20 ml dioxánnal készült szuszpenziójában 350 mg szilárd trifoszgénnel (beszerzési helye: Janssen) kezelünk, az elegyet 90 percig 60 °C hőmérsékleten keverjük, és szükség esetén a teljes oldódás elérésére igen kis adagokban további trifoszgént teszünk hozzá.

Ezután az oldatot 400 ml hexánba öntjük, és az elegyet másnapig -20 °C hőmérsékleten állni hagyjuk. A kristályos csapadékot kis mennyiségű etil-acetátban oldjuk, az oldatot 40 °C hőmérsékleten szénnel derítjük, majd hexánt adunk hozzá. Ekkor a kívánt termék fehér kristályok alakjában kicsapódik. Az így kapott terméket ismételten tisztítjuk, s így fehér kristályokat kapunk.

1. példa

A) Beépített primer aminokat tartalmazó hordozó előállítás vicinális diol térközcsoport útján (amino-diol-csoportos hordozó)

5 g Eupergit-C gyöngyöt (glicidilcsoportokat tartalmazó poliakrilamid-gyanta, a Sigma cég terméke) 100 ml 0,1 M foszfát-pufferoldatban szuszpendálunk, amely 1 mM EDTA-t tartalmaz, és pH értéke 6,0 és 1 g (6,5 mmol) ditio-treitet (röviden: DTE), azaz nagy felesleget adunk hozzá keverés közben. A heterogén keveréket szobahőmérsékleten 2 napig keverjük, utána a gyöngyökről a folyadékot leszívjuk, s a gyöngyöket a fenti foszfát-pufferoldattal mossuk. Az elemzést úgy végezzük, hogy körülbelül 50 mg alkikvot részt kiveszünk, és 1 órán át szobahőmérsékleten 10 ml 10 millimólos DMF-os 2,2'-ditio-piridinnel keverjük. A gyöngyökről a folyadékot leszívjuk, DMF-dal, majd diklór-metánnal (röviden: DKM) mossuk, ismét 5 ml DMF-ban szuszpendáljuk, és az -SS- kötést 1 csepp merkaptó-etanollal (EtSH) hasítjuk. 30 perces keverés után a gyöngyöket szűrőssel elkülönítjük, és a szűrletben a 2-tio-piridont 343 nm hullámhosszon mért abszorbanciával ($\epsilon = 8080$) M.C. Millot és munkatársai módszerével [J. Chromatography 354, 155

(1986)] meghatározzuk.

A gyöngyöket (azaz a minta kivétele után maradt részt) 100 ml 0,5 M Tris-HCl-ban (0,5 mM EDTA) szuszpendáljuk (pH-értéke 8,5), és 2-bróm-etil-amin hidrobromidot adunk hozzá (az előbb leírt elemzés eredménye alapján számított mennyiségben) úgy, hogy a bróm-amin tiolhoz viszonyított molaránya 50 legyen, K. Okazaki és munkatársai módszere szerint [Anal. Biochem. 149, 516 (1985)]. Az elegyet szobahőmérsékleten 2 napig keverjük, utána a gyöngyökről a folyadékot leszívjuk, a gyöngyöket azonos pufferoldattal, majd vízzel mossuk, és vákuumban szárítjuk.

A szabad aminosz csoportok elemzését C.C.Y. Lee és G.M. Loudon szerint végezzük [Anal. Biochem. 94, 60 (1979)]; átlagértéke (több sarzs átlaga): 1 g száraz gyöngyre vonatkoztatva 50 μmol $-\text{NH}_2$ csoport.

A fenti reakciósort a 4) reakcióvázzal szemléltetjük.

B) DTPA aldehidszármazékának az előállítás

1 g (2,8 mmol) DTPA-bisz-anhidridet (caDTPA) (a Pierce Chemicals cégtől szereztük be) 100 ml száraz DMF-ban oldunk, 10 mmol trietil-amint (röviden: TEA), majd 2 g (0,1 mmol) előző A) lépésben előállított gyöngyterméket adunk hozzá. A szuszpenziót 24 órán át szobahőmérsékleten keverjük, majd a folyadékot leszívjuk, a terméket DMF-dal mossuk, és ismét szuszpendáljuk 100 ml DMF-ban, amely 1 g (2,8 mmol) caDTPA-t és 10 mmol TEA-t tartalmaz. 24 órás keverés után a gyöngyökről a folyadékot ismét leszívjuk, és a terméket előbb DMF-dal, majd dimetil-szulfoxiddal (röviden: DMSO), végül enyhén só-

savas vízzel mossuk. Ezt követően a gyöngyöket 10 ml 7-es pH-értékű 0,1 M foszfátpufferban szuszpendáljuk, mely utóbbi 0,01 M nátrium-metaperjodátot tartalmaz, és fénytől védve 30 percig keverjük. Ekkor a gyöngyökről a folyadékot leszívjuk, és a terméket azonos pufferoldattal mossuk. A szűrletet és a mosófolyadékokat egyesítjük.

A szűrletet (amely a mosófolyadékokat is tartalmazza) sósavval 2 pH-ig savanyítjuk, és forgóbepárló készüléken (rotavaporon) körülbelül 2 ml térfogatra töményítjük. A maradékot ioncserélő gyantával (Dowex 1x8 acetátformában, finomsága 20-50 száraz "mesh" töltött 20 x 1 cm méretű oszlopon vezetjük át. Az eluálást gradiensen növekvő koncentrációjú ecetsavoldattal (pH = 3), 2 ml/perc sebességgel végezzük. Az egymást követő frakciók alikvot részét (2 ml) aldehidcsoportra vonatkozóan elemezzük J. Bartos és munkatársai módszerével [Pure Appl. Chem. 51, 1803 (1979)] úgy, hogy ciklohexanonnal és ammónium-karbonáttal kezeljük, majd a fluoreszcenciát mérjük. Összesen 10 frakció közül a 6. és 7. frakciók tartalmazzák a DTPA aldehidszármazékának tulnyomó részét. Az aldehid-pozitív (aldehidtartalmú) frakciókat egyesítjük, és liofilizáljuk. A terméket Bartos és munkatársai fentebb idézett módszere szerint ¹H-NMR spektroszkópiai vizsgálatnak vetjük alá, és aldehidre elemezzük.

A szárított termék tömege arra utal, hogy a hordozóról végbemenő felszabadulás körülbelül 100%-ban végbemegy; valószínű, hogy az így kapott DPTA aldehiddel monoszubsztituált, mivel a hálós szerkezetű matrix feltehetően sztérikus gátlás útján meggátolja a DTPA kétszeres kötődését a szilárd fázis-

hoz. Az aldehidcsoport mérése azonban azt mutatja, hogy az elméleti szubsztitúció csak felerészben ment végbe. Ez az eltérés esetleg azzal magyarázható, hogy a felszabadulás során bizonyos mértékben túloxidáció következik be, és ennek következtében az aldehidcsoportok egy része karboxilcsoporttá alakul. A fenti reakciókat az 5) reakcióvázlattal szemléltetjük [az (A) általános képletű vegyület a fenti A) lépésben előállított amino-diol-hordozó].

2. példa

Beépített DTPA-t tartalmazó, aldehidcsoportos poli(L-lizin) előállítása

a)

Az (alkil-oxi-karbonil)-csoporttal védett lizin N-karboxi-anhidridjének (röviden: N-karboxi-anhidrid = NCA) polimerizációját a fenti 1. példában előállított (A) általános képletű amino-diol-hordozó aminocsoportjával indítjuk meg (iniciáljuk). Az (1) képletű, BL jelű ϵ -(benzil-oxi-karbonil)-L-lizint, valamint a (2) képletű, FL jelű ϵ -(fluorenil-metil-oxi-karbonil)-L-lizint - azaz a védőcsoportos lizin-monomereket - a Bachem-cégtől (Svájc) szereztük be. A megfelelő N-karboxi-anhidrideket (NCA-kat) W. H. Daly és munkatársai szerint [Tetrahedron Letters 46, 5859 (1988)] szilárd trifoszfén reakcióval állítjuk elő, amelyhez oldószerként THF-t használunk.

b)

10 mmol BL- vagy FL-NCA-t 2 g (0,1 mmol) 1. példában előállított amino-diol-hordozóval 40 ml dioxánban (BL-NCA esetén) vagy 40 ml DMF-ban (FL-NCA esetén) szobahőmérsékleten

3 napig keverünk. A gyöngyökről a folyadékot leszívátjuk, a gyöngyterméket rendre dioxánnal, majd DMF-dal, végül diklór-metánnal mossuk, majd vákuumban szárítjuk és mérjük. A poli-mer mennyiségét a hordozó tömegének növekedéséből számítjuk ki. Így a BL-termék esetében 90%, az FL-termék esetében 40% hozamot érünk el.

5 g poli(ϵ -fluorenil-metil-oxi-karbonil)-L-lizinnel (röviden: PFL) derivatizált szubsztrátumot 50 ml 20%-os DMF-os piperidinoldattal keverve eltávolítjuk a metil-fluorenil-védő-csoportot. A reakció után a gyöngyterméket többször mossuk DMF-dal, majd DKM-nal, és vákuumban szárítjuk. A védőcsoport eltávolítása közel 100%-os hozammal megy végbe.

1 g poli(ϵ -benzil-oxi-karbonil)-L-lizinnel (röviden: PBL) derivatizált szubsztrátumot (gyöngyterméket) 50 ml, bróm-hidrogénsavat és ecetsavat 33:67 arányban tartalmazó eleggyel 60 percig keverve a védőcsoportot eltávolítjuk, majd a gyöngy-terméket előbb vízzel, utána etanollal, végül DKM-nal mossuk, és vákuumban szárítjuk. Ebben az esetben a ninhidrinpróba sze-rint a védőcsoport eltávolítása nem megy végbe teljesen, így az alább leírt műveleteket előnyösen azzal a termékkel végez-zük, amelyből a metil-fluorenil-csoport eltávolítása közel 100% hozamot eredményez.

c)

1 g, védőcsoportot már nem tartalmazó, polilizinnel (PL) derivatizált Eupergit gyöngyterméket 20 ml, 1 g caDTPA-t tartalmazó DMSO-ban 24 órán át szobahőmérsékleten keverünk, majd további 1 g caDTPA-t adunk hozzá, és a reakcióelegyet további 24 órán át keverjük. Ezt a műveletet addig ismételjük,

amíg a ninhidrinpróba szerint szabad aminocsoport már nincsen jelen (azaz színreakció nem mutatkozik). Ekkor a gyöngyterméket elkülönítjük, és a DMSO-t mosással eltávolítjuk.

d)

A beépített DTPA-t tartalmazó polilizin (PL) hordozó 20 ml 0,1 M foszfátpufferban (pH 7,0) szuszpendáljuk, amely 0,01 M nátrium-metaperjodátot tartalmaz, és a reakcióelegyet 30 percig fénytől védve keverjük. Ekkor a hordozóról a folyadékot leszívátjuk, és azonos pufferoldattal mossuk. A szűrletet a mosófolyadékkal egyesítjük, és 5 000 molekulatömeg-méretkizárási határral rendelkező membrán alkalmazásával, vízzel szemben dializálva tisztítjuk. A maradékot liofilizálva körülbelül 50% hozammal kapjuk a polimert. Az aldehidcsoport elemzése azt mutatja, hogy a polimer láncoknak körülbelül 15%-a tartalmaz reakcióképes -CHO csoportot. Valószínű, hogy ez a hozam növelhető, ha a hordozóanyagról a felszabadítást enyhébb oxidációs körülmények között végezzük. Ez utóbbi reakciókat a 6) reakcióvázlatban szemléltetjük. (E vázlatban csak az FL termékkel végzett folyamatot mutatjuk be.)

3. példa

Beépített DTPA-t tartalmazó, tiolcsoportos poli(L-lizin) előállítás

a) A propántiol beépítése

4,24 g üvegtörmelék (ellenőrzött üvegporusmérete CPG-10-1000, beszerezhető a Fluka AG cégtől) előbb vízzel, majd forró salétromsavval mosunk, utána 50 ml (0,1 M 7-es pH értékű, 1 mM EDTA-t tartalmazó) foszfátpufferban szuszpendáljuk, és 4,24 ml olyan oldatot adunk hozzá, amelyet úgy

kaptunk, hogy 3,7 ml 3-(merkapto-propil)-trimetoxi-szilánt 20 ml 1:1 arányú acetátpuffer/etanol eleggyel (pH = 4) 2 órán át kevertünk. Az üvegtörmeléket a reakcióeleggyel másnapig keverjük, majd 1:1 arányú víz/etanol eleggyel mossuk, és 20 ml, 1,2 g (10 mmol) ditio-piridint tartalmazó etanolban ismét szuszpendáljuk. 2 óra múlva az üvegtörmeléket elkülönítjük, etanollal mossuk, szárítjuk. Így olyan terméket kapunk, amely 1 g üvegre vonatkoztatva 7 μ mol tiolcsoportot tartalmaz. Hasonló eljárással végezzük szilícium-dioxid-részecskék (Aerosil-A300), valamint alumínium-oxid és titán-dioxid (P25) tiolozását.

b) Az iniciátor beépítése

1,75 g tiolozott (tiolcsoportos) üvegtörmeléket 20 ml DMF-ban szuszpendálunk, és nagy feleslegben 250 mg (3 mmol) ciszteamint adunk hozzá. A szuszpenziót másnapig kezeljük, majd az üvegtörmeléket elkülönítjük, és sorrendben előbb DMF-dal, majd kloroformmal, etanollal, igen híg vizes savval, nátrium-hidrogén-karbonát-oldattal, végül DMF-dal mossuk.

c) Az ϵ -helyzetben védőcsoportot tartalmazó lizin polimerizációja

E műveletet a 2. példában közölt leíráshoz hasonlóan végezzük. 10 mmol FL-NCA-t 1 mmol, aminocsoporttal szubsztituált hordozóval (előállítását lásd fentebb) 48 órán át szobahőmérsékleten keverünk 50 ml frissen desztillált DMF-ban az aminszenyezés nyomainak eltávolítása céljából, majd a terméket elkülönítjük, DMF-dal és utána DKM-nal mossuk.

A védőcsoport eltávolítását DMF-ban piperidinnel végezzük a 2. példában leírtak szerint.

d) caDTPA beépítése a védőcsoportot nem tartalmazó ϵ -NH₂-csoportokra

A 2. példában ismertetett eljárást alkalmazzuk, a caDTPA-t feleslegben vesszük, és a reakciót addig folytatjuk, amíg a szabad NH₂-csoportok lényegében eltűnnek. Ekkor az üvegtörmeléket elkülönítjük, és előbb dioxánnal, majd DKM-nal mosva a DMSO-tól mentesítjük.

e) A beépített DTPA-t tartalmazó polimer felszabadítása

Az immobilizált, DTPA-val derivatizált polilizint tartalmazó üvegtörmeléket 20 ml 0,1 M, 1 mM EDTA-t tartalmazó foszfátpuffer (pH = 7) és 100 mg ditio-treit oldatában szuszpendáljuk, másnapig állni hagyjuk, majd az üvegtörmeléket szűrjük, és azonos pufferoldattal mossuk. A szűrletet vákuumban bepárolva kapjuk a terminális tiolcsoportot tartalmazó terméket 76% hozammal.

E reakciósort a 7) reakcióvázlatban szemléltetjük, ahol R az immobilizáló üveghordozót jelenti. A hordozó felületén számos hidroxilcsoport van jelen (a szilikagélből vagy adszorbeált nedvességből eredően), s ez lehetővé teszi a szilánszármazékkal végbemenő kondenzációt.

4. példa

Beépített DTPA-t tartalmazó, aldehidcsoportos polimer alkalmazása irányító vektorkonjugátumban, MRI kontrasztnövelő anyagok meghatározott területekre történő szállítása (eljuttatása) céljából

0,9 mg [körülbelül 6 nanomol (nmol)] nonspecifikus emberi emmunglobulint (röviden: nIg; a Sigma cégtől szereztük

be) 0,9 ml, 1%-os, 5,5 pH-értékű acetát-pufferoldatban oldunk, és a 2. példában készült, terminális adehidcsoportos polimert, valamint 20 μ l vízben oldott nátrium-[ciano-trihidrido-borát] adunk hozzá olyan mennyiségben, hogy az antitest/aldehid/redukálószer molaránya 1:10:5 legyen. A reakcióelegyet 8 órán át szobahőmérsékleten keverjük, majd további mennyiségben nátrium-[ciano-trihidrido-borát]-ot adunk hozzá, és a keverést 16 órán át folytatjuk. Ezután az elegyet 100 000 molekulatömeg-kizárási mérethatárú membránon át 10 mM, 0,15 M nátrium-kloridot tartalmazó, 7,2 pH-értékű pufferoldattal együtt a redukálószer feleslegének és az elreagálatlan polimernek az eltávolítása végett szűrjük.

Ekkor a 0,5 ml térfogatú oldatot gelszűrő oszlopon, amelyet előzőleg PBS-val egyensúlyba hoztunk, kromatografáljuk. Így két csúcsot kapunk: az első frakció nIg-t tartalmaz, a második frakció tartalmazza a kívánt, polimerrel kapcsolt nIg-t. Ez utóbbi frakciót 10 000 molekulatömeg-kizárási határú membránszűrőn szűrjük, s így olyan terméket kapunk, amely közvetlenül felhasználható paramágneses ionokkal komplexképzésre, s utána befecskendezhető az in vivo MRI vizsgálatok során. E termék az Ig 1 molekulájára számítva körülbelül 50-100 Gd^{+3} iont képes komplex formájában megkötni.

További kísérleteinkben az nIg-t más irányító (célzó) faktorokkal cseréltük fel, és hasonló eredményekhez jutottunk.

5. példa

Beépített DTPA-t tartalmazó, tiolcsoportos polimerek alkalmazása irányító, befecskendezhető (injekciós) konjugátumban MRI kontrasztnövelő szelektív szállí-

**tására (eljuttatására) meghatározott területekre
in vivo körülmények között**

0,9 mg nIg (vagy egér elleni CEA 35-5 termék, amely beszerezhető az Institute of Biochemistry intézménytől, Lausanne) és 0,9 ml PBS-pufferoldat keverékéhez 60 nmol N-szukcinimidil-4-(N-maleinimido)-butirát (röviden: SMBU; beszerezhető a Sigma cégtől) 50 μ l DMF-dal készült oldatát adjuk. A reakcióelegyet 1 órán át szobahőmérsékleten állni hagyjuk, majd az oldatot 10 000 molekulatömeg kizárási határú membránon PBS-val szűrve az SMBU felesleget eltávolítjuk.

A szűrlethez 16 nmol 3. példában készült, tiolcsoportot DTPA-polilizin 40 μ l PBS-val készült oldatát adjuk, a reakcióelegyet 2 órán át szobahőmérsékleten állni hagyjuk, majd a konjugátumot a fenti 4. példában leírt módon tisztítjuk, s így olyan befecskendezhető oldatot kapunk, amely MRI kontrasztnövelő vizsgálatok során in vivo körülmények között alkalmazható.

6. példa

Makro-térhálós polisztirolgyantából készült gyöngyöket (beszerezhető a Plysciencies intézménytől) 48 órán át TFA-ban áztatunk, majd rendre dimetil-formamiddal, dioxánnal, végül metanollal mossuk. 15,5 g így kapott gyöngyöt 80 ml kloroformban szuszupendálunk, és 1,8 ml (13,7 mmol) ón(IV)-bromid és 18,6 ml (228 mmol) (bróm-metil)-metil-éter elegyét csepegtetjük hozzá keverés közben 0 °C hőmérsékleten nitrogénatmoszférában. A reakcióelegyet egy ideig állni hagyjuk, majd az így kapott gyantát sorrendben előbb 3N dioxános hidrogén-klorid-oldattal (3:1 arányban), utána dioxánnal, metanollal, végül

kloroformmal mossuk, és szárítjuk. A szárított gyöngyterméket 90 ml DMF-ban szuszpendáljuk, visszafolyatós hűtő alatt nitrogénatmoszférában 100 °C-ra melegítjük, 2,1 g (27,9 mmol) tio-karbamid kis mennyiségű dimetil-formamiddal készült oldatát adjuk hozzá, majd a reakcióelegyet másnapig 100 °C hőmérsékleten tartjuk. A gyöngyterméket DMF-dal mossuk, majd 3,6 g bisz(3-amino-propil-amin)-t tartalmazó 90 ml DMF-ban ismét szuszpendáljuk, és nitrogénatmoszférában másnapig 100 °C-on melegítjük. Ezután a gyöngyöket rendre dimetil-formamiddal, dioxánnal, végül kloroformmal mossuk, és vákuumban szárítjuk.

Az így kapott 15,5 g gyantát (amely 512 mikroekvivallens -SH csoportot tartalmaz) 140 ml 50%-os vizes etanolban szuszpendáljuk, amely 0,8 g (10,4 mmol) ciszteamint tartalmaz, és addig adagolunk hozzá 3%-os hidrogén-peroxidot, amíg a reakcióelegy egy alikvot részlete a jód/kálium-jodid-oldatot már nem redukálja. Ezután másnapig keverjük, majd a gyöngyterméket előbb víztartalmú etanollal, majd vízzel mossuk. Ezután éjszaka át Soxhlet-készülékben metanol és kloroform 1:1 arányú elegyével extraháljuk, s utána vákuumban szárítjuk.

8 g beépített amin-diszulfidot tartalmazó szilárd fázist 30 ml dioxánban szuszpendálunk, és 5,2 g γ -benzil-glutamát-N-karboxi-anhidrid (BG-NCA) 20 ml dioxánnal készült oldatát adjuk hozzá. A reakcióelegyet 3 napig keverjük, majd a gyantáról a folyadékot leszívátjuk, és a gyantát dioxánnal, metanollal, végül kloroformmal mossuk. 4 g, immobilizált poliglutamátot tartalmazó gyöngyterméket 35 ml benzolban szuszpendálva 40 ml, hidrogén-bromiddal telített benzolhoz adunk, és az elegyet 1 órán át keverjük, miközben folyamatosan

brómhidrogéngázt buborékoltatunk át rajta. Ekkor a gázbevezetést megszüntetjük, és a keverést másnapig folytatjuk, majd a gyöngyterméket elkülönítjük, és a szokásos módon mossuk; utolsó oldószerként DKM-t alkalmazunk. Ezt követően az immobilizált poliglutaminsav szabad karboxilcsoportjait a szokásos körülmények között etiléndiaminnal amiddá alakítjuk, majd a terminális szabad aminocsoportos oldalláncot caDTPA-val reagáltatjuk az előző példákban leírt módon. Végül a gyöngyterméket DMF-ban szuszpendáljuk, és a tiolcsoporttal aktivált polikelátozó molekulát 3% tioetanol (az oldószer térfogatára vonatkoztatva) hozzáadásával felszabadítjuk. A felszabadulás hozama 72 órán át 120 °C hőmérsékleten végzett hasítás után meghaladja az 50%-ot. A végterméket úgy kapjuk, hogy a szilárd fázist szűréssel elkülönítjük, és a szűrletet vákuumban bepároljuk. Az elkülönített szilárd fázis egy következő gyártási ciklusban ismételten felhasználható.

A jelen találmány megvalósítási formáiban főként lineáris vázú poli(alkilén-amino)-polikarbonsav típusú kelátképzőket, például EDTA vagy DTPA szerkezetű anyagokat alkalmaztunk. Alkalmazhatók természetesen eltérő szerkezetű kelátképzők is, így csillagszerű szerkezettel bíró vegyületek, például a nitrilo-triecentsav és a trietilén-amino-hexaecetsav homológ; valamint makrociklusos kelátképző, amilyen a ciklotetraza-dodekán-tetraecetsav (röviden: DOTA), valamint egyéb, hasonló szerkezetű vegyületek (lásd például a 3 401 052 számú német közrebocsátási iratot). A találmány szerinti eljárásban olyan poli(alkilén-amino)-polikarbonsav-származékok is alkalmazhatók, amelyek molekulájában egy vagy több karboxilcsoport-

tot hidroxil-, alkoxi- vagy amidcsoport helyettesít; erre tipikus példa egy olyan kelátképző vegyület, amely alkoxi-oldalláncot tartalmaz; így az a DTPA-analóg, amellyben egy terminális karboxilcsoportot benzil-oxi-csoport helyettesít (BOPTA).

Szabadalmi igénypontok

1. Eljárás a (III) általános képletű konjugátumegységek előállítására az élő szövetek bioaktív sejt-jelzőhelyivel szemben specifikusan válaszképes és/vagy azokkal specifikusan kötődő irányító faktorokkal történő kapcsolásra, adagolható, célzott, olyan konjugátumok létrehozása (kialakítása) céljából, amelyek képesek paramágneses MRI kontrasztnövelő egységet (egységeket) szelektíven szállítani (eljuttatni) meghatározott szervekhez vagy szövetekhez, s ahol a (III) általános képletű konjugátumegység legalább egy poli(alkil-amino)-polikarbonsav kelátképzőt tartalmaz, és a (III) képletben

x^1 jelentése -CHO vagy -SH csoport;

Alk jelentése 1-4 szénatomos alkilénecsoport, amely adott esetben -S- csoportot tartalmaz;

Z jelentése 1-4 szénatomos, adott esetben -COO- csoportot tartalmazó alkilénecsoport; és

legalább az egyik Y jelentése poli(alkilén-amino)-polikarbonsav kelátképző molekula (és a másik Y, amennyiben jelen van, hidrogénatom lehet) szabad sav vagy paramágneses ionokkal alkotott komplex formájában;

n értéke 0-tól körülbelül 100-ig terjedő egész szám; és

M jelentése az -NH és Y közötti kötés, amely lehet egy amidkötés, amely magában foglalja az Y csoport -CO részét és a (III) képletű vegyület -NH részét; vagy lehet egy szerves, hídalkotó szubsztituens, amely az Y alkilén-szénatomjához kapcsolódik,

aminek során

- 1a) egy (I) általános képletű vegyületet - amelyben X jelentése -S- vagy -CHOH- csoport, és Alk, Z és n jelentése a fentebb meghatározott - az Y kelátképző (IIa) általános képletű acilező származékával - amelyben a karboxilcsoportoknak legalább egyike acilezésre alkalmas derivatizált formában, például intra- vagy intermolekuláris anhidrid, halogenid, reakcióképes amid vagy reakcióképes észter alakjában van - acilezünk; vagy
- 1b) egy (I) általános képletű vegyületet reagáltatunk a poli(alkilén-amino)-polikarbonsav kelátképző (IIb) általános képletű származékával, amely egyik alkilén-szénatomon reakcióképes benzol-diazónium-, halogén-acetamido-fenil-, halogén-acetamido-benzil-, izocianato-fenil-, izotiocianato-fenil- vagy azo-imidát hidalkotó csoporttal szubsztituált; és
- 2) az így kapott (IV) általános képletű vegyület -XX- kötését hasítva egy (III) általános képletű vegyülethez jutunk, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy az (I) és (IV) általános képletekben R jelentése olyan immobilizáló, szilárd fázis, amelyhez az (I) és (IV) általános képletű molekulák többi része kovalensen kötődik vagy közvetlenül, vagy egy kötőcsoport (térköztartó csoport) útján, amelyet előzetesen építünk be a szilárd fázis felületére, s aminek során a 2) lépésben végzett hasítás után a szilárd fázist regeneráljuk, és egy következő előállítási ciklusban ismételten felhasználjuk.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy poli(alkilén-amino)-polikarbonsav

kelátképző (IIa) általános képletű származékaként egy (IIc) általános képletű intermolekuláris anhidridet alkalmazunk, amelynek két geminális acetoxicsoportja imino-dieetsav-anhidrid-gyűrű alakjában van.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy az R-rel jelölt szilárd fázisként porózus vagy nem porózus, szerves vagy ásványi részecskéket vagy gyöngyöket alkalmazunk.

4. A 3. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy szerves fázisként polisztirol, szefaróz, agaróz, tioszefaróz, poliakrilát, poliakrilamid, poliészter, poliamid, poliimid polimer gyantát, ásványi fázisként üveget, fém-oxidot vagy kerámiaanyagot, porózus vagy nem porózus szűrőgyöngyök alakjában, vagy üveg-, szilikagél-, alumínium-oxid-, cirkónium-dioxid-, titán-dioxid-port alkalmazunk.

5. A 2. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy (I) és (IV) általános képletű vegyületekként olyan vegyületeket alkalmazunk, ahol X^1 -SH csoportot, X -S- csoportot, Alk etiléncsoportot, Z tetrametiléncsoportot jelent, n értéke körülbelül 50 és 110 között van, és m értéke 2.

6. A 2. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy (I) és (IV) általános képletű vegyületekként olyan vegyületeket alkalmazunk, ahol X^1 -SH csoportot, X -S- csoportot, Alk etiléncsoportot, Z $-(CH_2)-COO(CH_2)_2-$ csoportot jelent, n értéke 50 és 110 között van, és m értéke 2.

7. Az 5. vagy 6. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy a 2) hasítási lépést hidrolízissel hajtjuk végre.

8. A 2. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy (I) és (IV) általános képletű vegyületekként olyan vegyületeket alkalmazunk, ahol X^1 -CHO csoportot, X -CHOH- csoportot, Alk -CH₂S(CH₂)₂- csoportot, Z -(CH₂)₄- csoportot jelent, n értéke 50 és 110 között van, és m értéke 2.

9. A 2. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy (I) és (IV) általános képletű vegyületekként olyan vegyületeket alkalmazunk, ahol X^1 -CHO csoportot, X -CHOH- csoportot, Alk -CH₂S(CH₂)₂- csoportot, Z -(CH₂)₄- csoportot jelent, n értéke zérus, és m értéke 2.

10. A 8. vagy 9. igénypontok szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy a 2) hasítási lépést oxidációval hajtjuk végre.

11. Fehérjékhez történő kapcsoláshoz alkalmas, reakcióképes X^1 végcsoportot tartalmazó poli(alkil-amino)-polikarbonsav kelátképzők, amelyek (III) általános képletében

X^1 jelentése -CHO vagy -SH csoport;

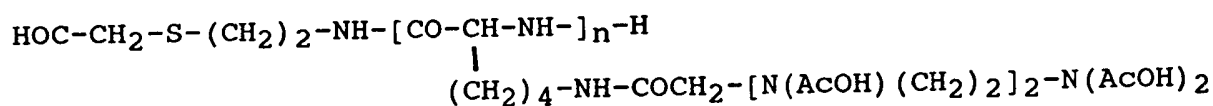
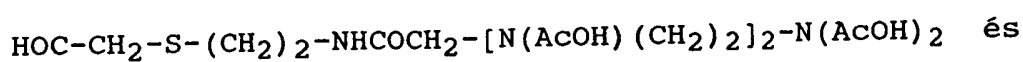
Alk jelentése 1-4 szénatomos alkiléncsoport, amely adott esetben -S- csoportot tartalmaz;

Z jelentése 1-4 szénatomos, adott esetben -COO- csoportot tartalmazó alkiléncsoport; és

legalább az egyik Y jelentése poli(alkilén-amino)-polikarbonsav kelátképző molekula (és a másik Y, amennyiben jelen van, hidrogénatom lehet) szabad sav vagy para-

n mágneses ionokkal alkotott komplex formájában;
 értéke 0-tól körülbelül 100-ig terjedő egész szám; és
 M jelentése az -NH és Y közötti kötés, amely lehet egy amidkötés, amely magában foglalja az Y csoport -CO részét és a (III) képletű vegyület -NH részét; vagy lehet egy szerves, hídalkotó szubsztituens, amely az Y alkilén-szénatomjához kapcsolódik.

12. A 11. igénypont szerinti



képletű vegyületek.

A meghatalmazott:

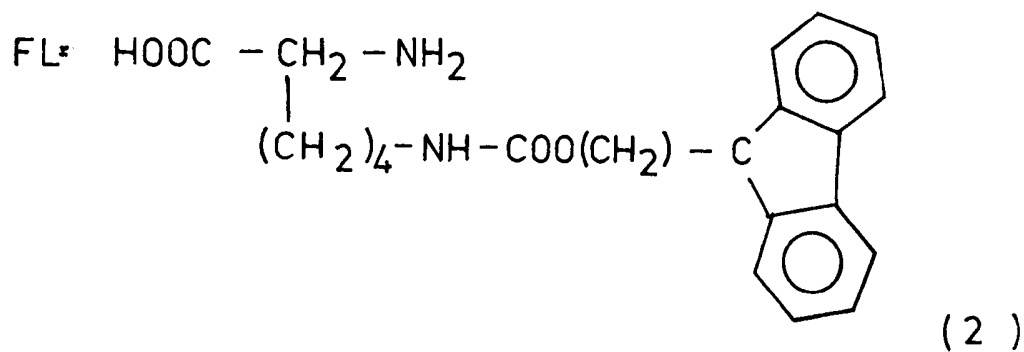
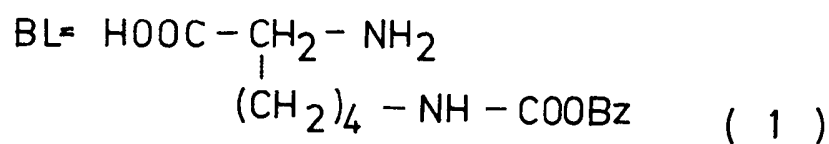
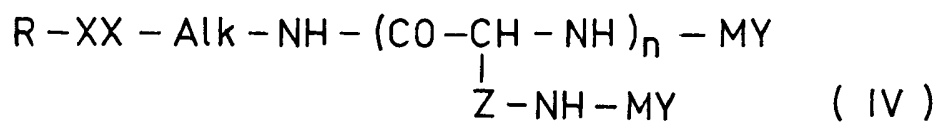
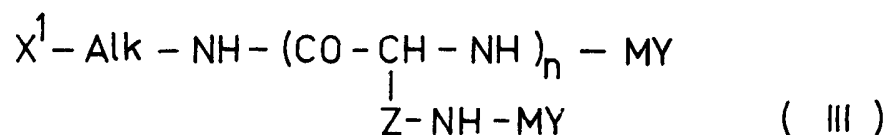
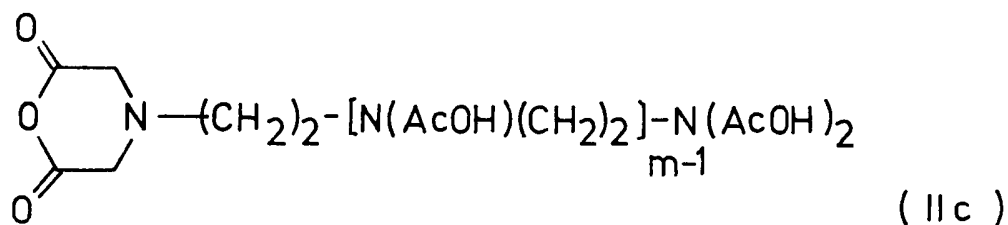
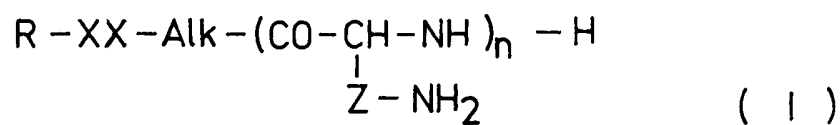
+ 6888 20-77

12

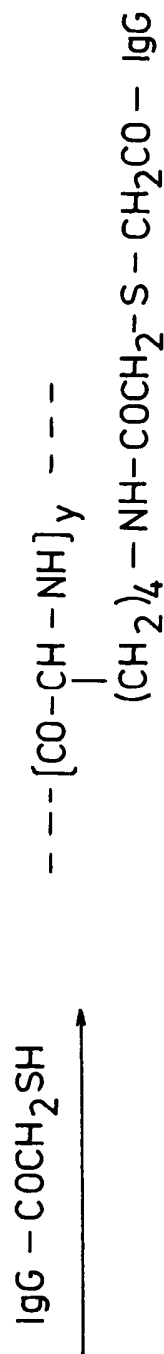
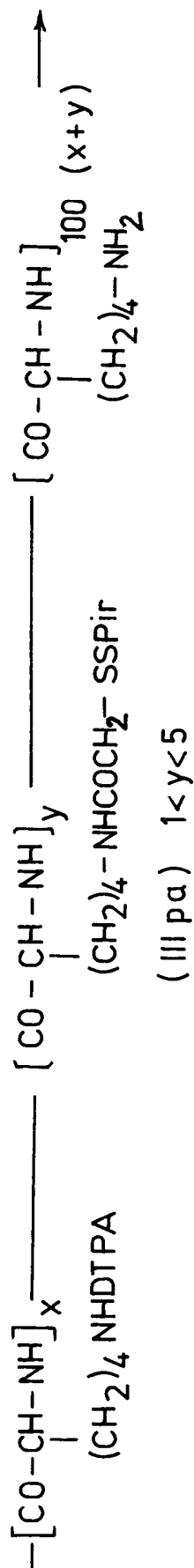
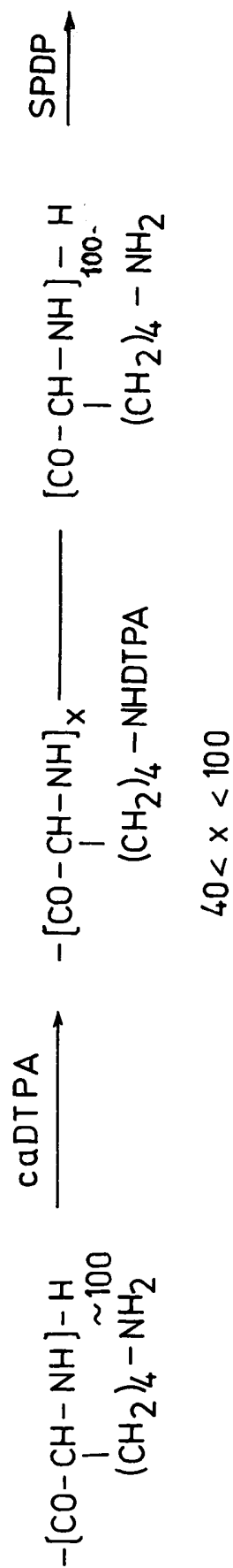
DANUBIA
 Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.
 5.

[Handwritten signature]

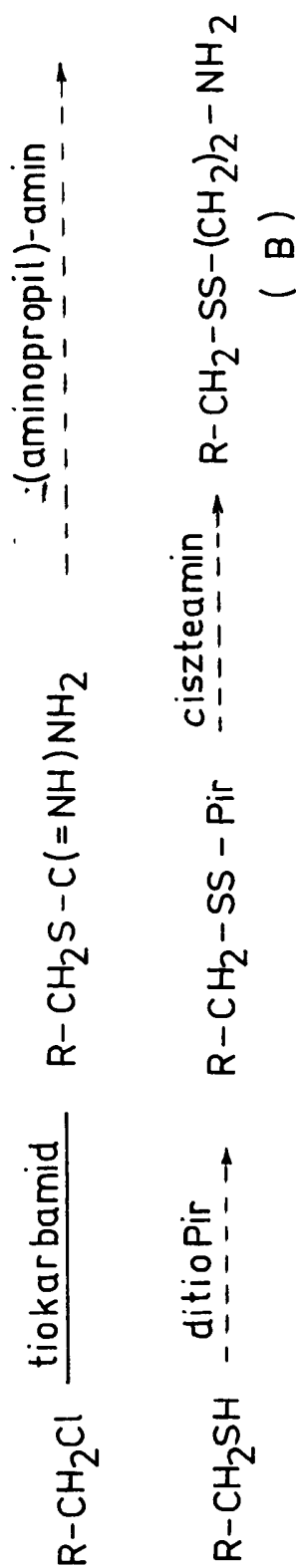
6/1



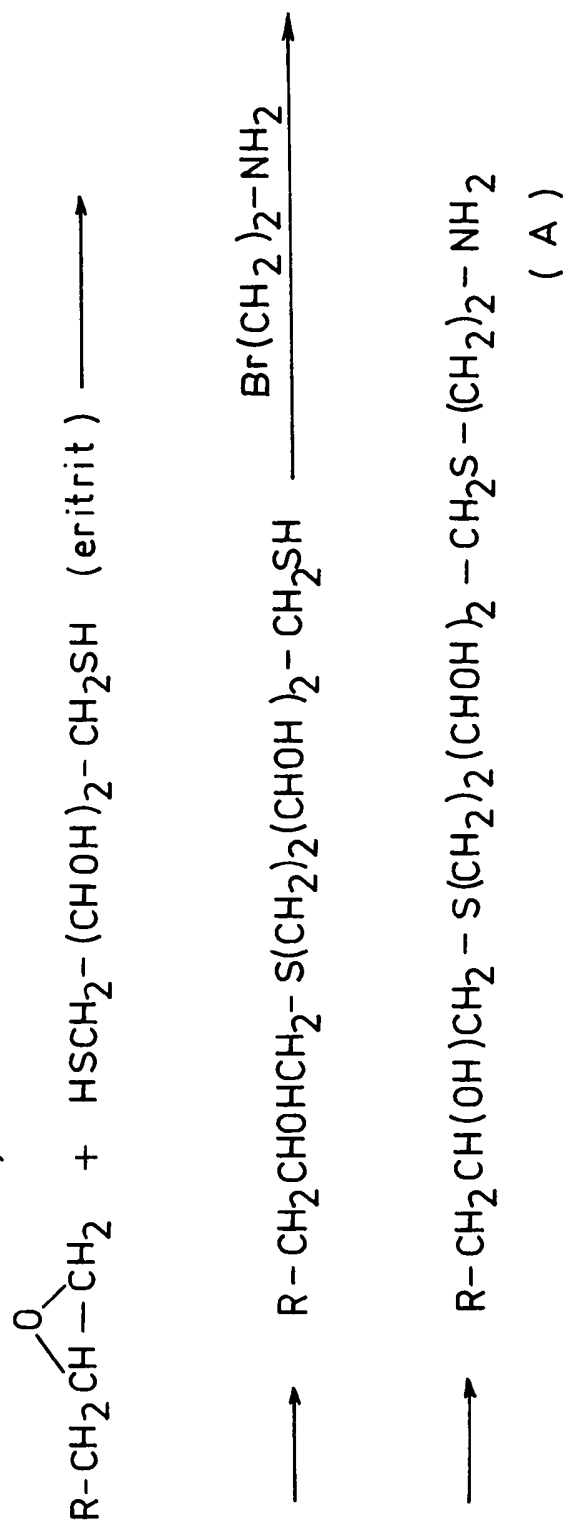
1) reakcióvázlat



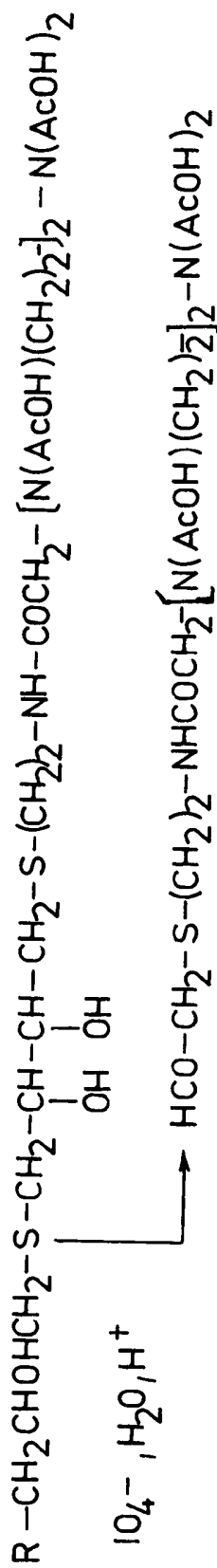
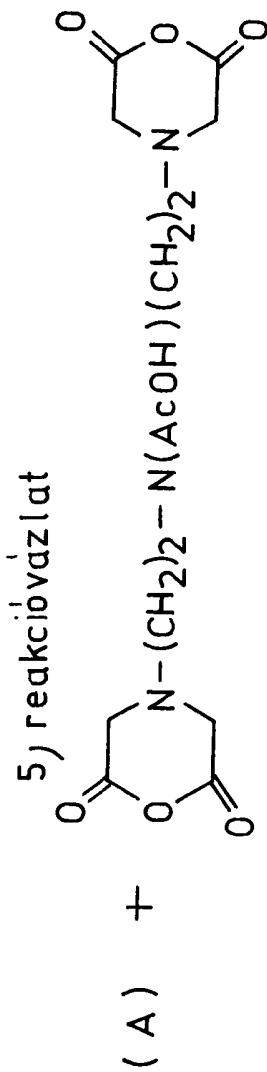
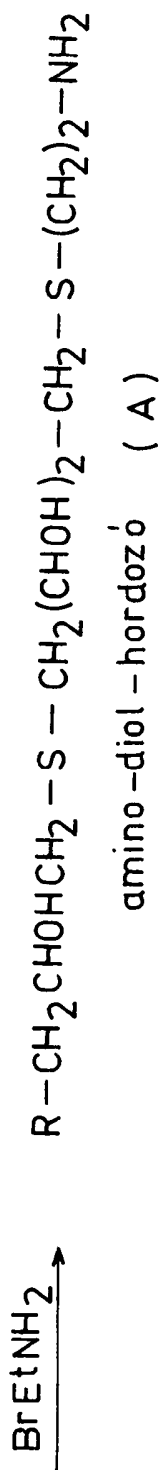
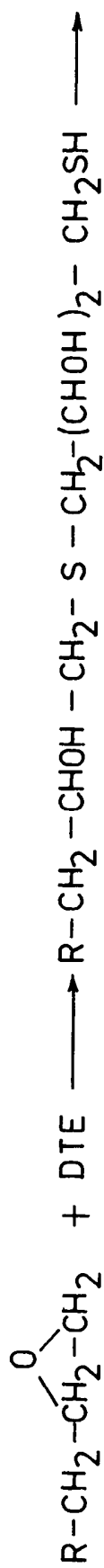
2) reakcióvázlat



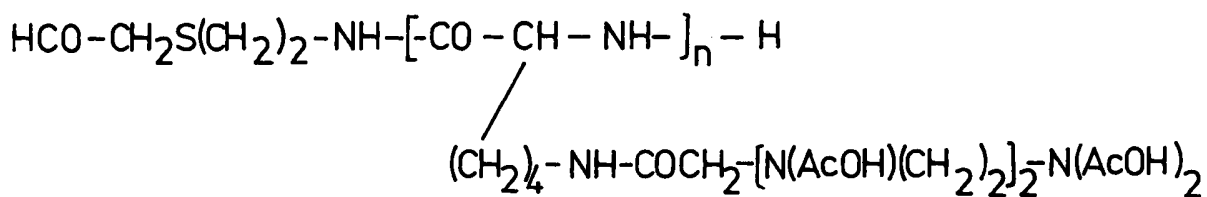
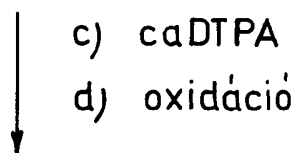
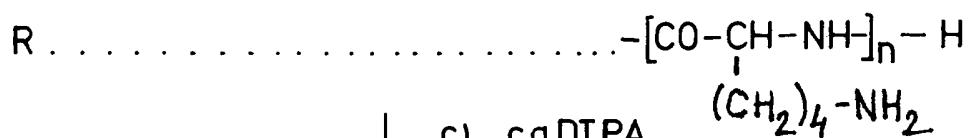
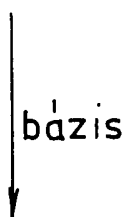
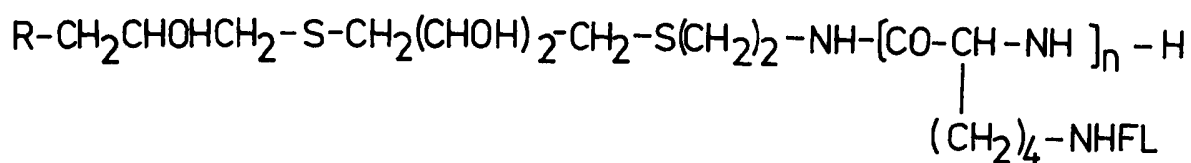
3) reakcióvázlat



4) reakcióvázlat



6. reakcióvázlat



7) reakcióvázlat

