



(19) INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
PORTUGAL

(11) *Número de Publicação:* PT 93264 B

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 6)

C07D207/46 A

C07D401/04 B

C07D417/12 B

G01N033/534 B

A61K051/00 B

(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

(22) *Data de depósito:* 1990.02.23

(30) *Prioridade:* 1989.02.24 US 315270

(43) *Data de publicação do pedido:*
1990.08.31

(45) *Data e BPI da concessão:*
10/95 1995.10.17

(73) *Titular(es):*

JOHNSON MATTHEY INC
4 MALIN ROAD MALVERN, PENNSYLVANIA 19355
US

(72) *Inventor(es):*

MICHAEL J. ABRAMS US
DAVID A. SCHWARTZ US
CHRISTEN M. GIANDOMENICO US
JON A. ZUBIETA US

(74) *Mandatário(s):*

ANTÓNIO LUÍS LOPES VIEIRA DE SAMPAIO
RUA DE MIGUEL LUPI 16 R/C 1200 LISBOA PT

(54) *Epígrafe:* PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE HIDRAZINA BIFUNCIONAL OU DE DERIVADOS DE HIDRAZINA DE CONJUGADOS QUE OS CONTÊM E DE MACROMOLÉCULAS MARCADAS COM IÕES METÁLICOS

(57) *Resumo:*

[Fig.]

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 93.264

REQUERENTE: JOHNSON MATTHEY INC., norte-americana, com sede em 460 East Swedesford Road, Wayne, Pennsylvania 19087, Estados Unidos da América,

EPÍGRAFE: "Processo para a preparação de hidrazina bifuncional ou de derivados de hidrazida de conjugados que os contêm e de macromoléculas marcadas com iões metálicos"

INVENTORES: David A. Schwartz,
Michael J. Abrams,
Christien M. Giandomenico,
Jon A. Zubieta,

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4.º da Convenção de Paris de 20 de Março de 1883.

U.S.A., 24.02.1989, sob o Nº 315 270

JOHNSON MATTHEY INC.

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE HIDRAZINA BIFUNCIONAL OU DE DERIVADOS DE HIDRAZIDA DE CONJUGADOS QUE OS CONTÊM E DE MACROMOLÉCULAS MARCADAS COM IÕES METÁLICOS"

Pedidos de patente de invenção relacionados

O presente pedido de patente de invenção constitui uma continuação, em parte, de o pedido de patente de invenção norte-americano série nº 07/315.270 requerido em 24 de Fevereiro de 1989.

Antecedentes da invenção

A presente invenção refere-se a compostos bifuncionais capazes de ligarem iões metálicos, particularmente o tecnécio e o rénio, a moléculas úteis sob o ponto de vista biológico.

Devido à sua grande especificidade biológica, certas macromoléculas (por exemplo, anticorpos monoclonais) têm sido utilizados para dirigir radioisótopos para sítios específicos in vivo com o fim de criação de imagem e/ou fins terapêuticos. O uso do isótopo metastável de tecnécio, ^{99m}Tc , para o diagnóstico em medicina nuclear está confirmado e podem ser utilizados os isótopos de

emissão beta de rénio ^{186}Re , ^{188}Re e ^{189}Re com fins terapêuticos. Estão descritos diversos métodos de ligação do tecnécio a macromoléculas. Alguns destes métodos envolvem a redução de grupos di-sulfureto nas macromoléculas (usualmente uma imunoglobulina) para tióis e a subsequente utilização destes grupos para ligar o tecnécio reduzido (por exemplo, Mckenzie et al., International Publication nº WO 87/04164; e Brener et al., EPO 271 802 A2). Os métodos deste tipo contêm várias desvantagens potenciais. A redução das unidades de di-sulfureto pode conduzir a uma desnaturação da proteína e a uma subsequente perda da especificidade biológica. Também, o método pode não ser utilizado para marcação de macromoléculas a que faltam os grupos di-sulfureto. Alternativamente, o tecnécio ^{99m}Tc pode ligar-se a macromoléculas através de quelatos bifuncionais como a DTPA (D. Lanteigne e D.J. Hnatowich; "Int. J. Appl. Radiat. Isot.", 35 (7), (1984) p. 617, chelating thiosemicarbazones (Y. Arano et al., "Int. J. Nucl. Med. Biol.", 12, (1985) p. 425, e diamidedithiol ligands (A. Fritzberg, pedido de patente de invenção europeia 188 256 2A). Os problemas associados com estes métodos incluem a ligação não específica significativa do tecnécio (que se liga à proteína em sítios diferentes dos grupos de quelação) e a baixas cinéticas lentas do marcador de Tc.

Deste modo, constitui um objectivo da presente invenção proporcionar novas moléculas bifuncionais contendo hidrazina ou grupos hidrazídicos e grupos de

proteínas reactivos que podem ser utilizados para a ligação de iões metálicos, tais como ^{99m}Tc a macromoléculas.

Um outro objectivo da presente invenção é proporcionar um método para a marcação de macromoléculas com iões metálicos em que a ligação de um metal em sítios diferentes dos grupos de quelação é mínima e em que ocorre a marcação com uma relativa rapidez (menos do que uma hora à temperatura ambiente).

Sumário da invenção

De acordo com a presente invenção, proporcionam-se novas hidrazinas e sais de hidrazida bifuncionais, assim como seus conjugados. Também se proporcionam os métodos de marcação dos conjugados com os iões metálicos.

Grossomodo, os compostos de hidrazina e de hidrazida aqui descritos como hidrazinas ou hidrazidas aromáticas bifuncionais, contêm um substituinte reactivo de proteína e um contra-íão negativo. Também se proporciona uma modificação da presente invenção em que a função hidrazina ou hidrazida está protegida sob a forma de uma alquil-(inferior)-hidrazona.

Num outro aspecto desta invenção, os conjugados formam-se mediante reacção da hidrazina ou hidrazida bifuncional da presente invenção com macromoléculas tais como proteínas, polipéptidos ou glicoproteínas. Os compostos bifuncionais reagem com grupos nucleofílicos nas macromoléculas (por exemplo resíduos de lisina) para proporcio-

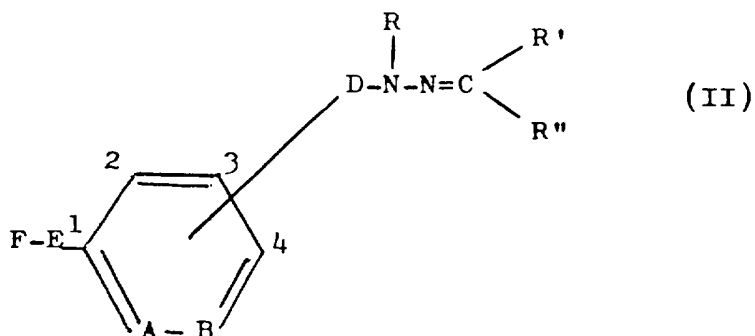
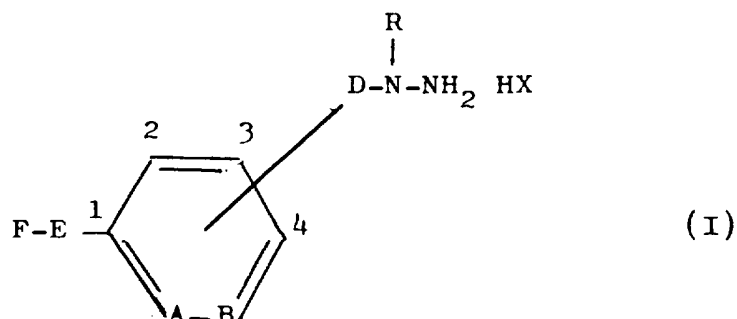
narem conjugados que contêm grupos hidrazina/hidrazida livres.

Num terceiro aspecto, formam-se macromoléculas marcadas constituídas por conjugados e por iões metálicos.

Num quarto aspecto, proporciona-se um método para a marcação de macromoléculas mediante reacção de um conjugado desta invenção com uma espécie metálica.

Descrição detalhada da presente invenção

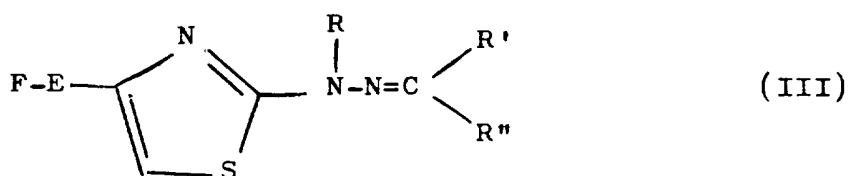
Os novos compostos hidrazínicos ou hidrazídicos desta invenção representam-se por uma das fórmulas gerais seguintes



em que

- A e B representam cada um, um átomo de carbono ou de azoto;
- D representa uma ligação directa, (nas posições 2⁻, 3⁻ ou 4⁻ do núcleo) ou um grupo CH₂,
C = D ou HN - $\overset{\text{S}}{\underset{\text{H}}{\text{C}}}$;
- E representa um grupo C = O ou forma, considerado conjuntamente com F, um grupo maleimidilo;
- F representa um grupo facilmente substituível por uma amina primária em meio aquoso alcalino ou neutro quando E representa um grupo C = O ou forma, considerado conjuntamente com E, um grupo maleimidilo;
- R representa um átomo de hidrogénio ou um grupo alquilo inferior;
- R' e R'', iguais ou diferentes, representam, cada um, um átomo de hidrogénio ou um grupo alquilo inferior; e
- X representa um contra-íão negativo

Um outro aspecto da presente invenção inclui os compostos de fórmula geral



na qual

R, R', R'', E e F têm os significados definidos anteriormente.

Quando E representa um grupo carbonilo C = O, F representa um qualquer grupo que, em associação com o grupo carbonilo ligado, forma um éster activo ou uma amida activa. Exemplos de espécies apropriadas representadas por F incluem diversos grupos como N-oxissuccinimido, tetrafluorofenolato, N-oxibenzotriazol e imidazolato. Estes exemplos não se entendem como limitativos do âmbito da presente invenção.

Grupos apropriados para R, R' e R'' incluem, mas não se limitam, aos seguintes: um átomo de hidrogénio, um grupo metilo, etilo e propilo.

Exemplos de iões representados por X utilizáveis, são os halogenetos, nitratos, trifluoroacetatos, tetrafluoroborato e sulfato. Estes exemplos não se entendem como limitativos do âmbito dos contra-iões apropriados.

Os compostos descritos anteriormente são estáveis, derivados isoláveis de moléculas que contêm dois grupos com reacção cruzada: um grupo hidrazina /hidrazida e um grupo de proteína reactivo tal como o éster activo, amida activa ou o grupo maleimido.

Na síntese destes derivados estáveis, um grupo de protecção ácido labil tal como o t-butoxicarbonilo (t- BOC) é eliminado da hidrazina /hidrazida, em condições ácidas anidras, deixando o grupo da proteína reactiva inalterado e o grupo hidrazina /hidrazida numa forma protonada não reactiva. Alternativamente, o grupo hidrazina/hidrazida pode proteger-se sob a forma de um alquil-(inferior)-hidrazona.

Quando um composto bifuncional contendo uma função hidrazina /hidrazido (ou hidrazona protegida) protonada é associado com uma macromolécula tal como uma proteína, um polipéptido ou uma glicoproteína em meio neutro ou ligeiramente básico, de preferência a um pH de cerca de 7-8,5, a parte proteínica reactiva do composto reagirá com grupos nucleofílicos da proteína, polipéptido ou da glicoproteína (por exemplo grupos amina como resíduos de lisina) para fornecer um conjugado contendo grupos hidrazina /hidrazida livres. No caso dos conjugados de hidrazona, forma-se a hidrazina /hidrazida livre por diálise em tampão ácido (pH 5,6). Devido a este tipo de conjugado incluir uma hidrazina ou uma hidrazida poderá em seguida fazer-se reagir rapidamente um grupo de ligação de metal forte

quando misturado com uma espécie metálica apropriada, em meio ácido, para se obter uma proteína marcada, polipéptido ou glicoproteína.

A espécie metálica pode ser, por exemplo, uma espécie de tecnécio reduzido formado por reacção de $Tc O_4^-$ com um agente de redução, por exemplo, um ião estannoso na presença de um ligando de oxigénio de quelação (por exemplo, gluco-heptonato). Exemplos de espécies de tecnécio reduzido incluem Tc-gluco-heptonato, Tc-gluconato, Tc-2-hidroxi-isobutirato, Tc-lactato e Tc-4,5-di-hidroxi-1,3-benzeno-di-sulfonato. Outros metais e ligandos são também abrangidos pela presente invenção.

Pode realizar-se de um modo conveniente um processo de marcação com Tc em tampão aquoso, de preferência a um pH de cerca de 4,5- 6,5 em uma hora ou menos. A reacção com outras espécies metálicas apropriadas ocorre de forma idêntica, em condições idênticas.

O rendimento radioquímico, determinado de acordo com a cromatografia líquida de alta resolução (CLAR) e cromatografia em camada fina (CCF) utilizando Tc é $\geq$ a 90%. O tratamento da proteína com análogos não ligáveis, (isto é, compostos com um grupo carbonilo reactivo da proteína, tal como o ácido 4-hidrazinobenzóico ou o ácido 6-hidrazinopiridino-3-carboxílico) não fornece proteína capaz de ligação de Tc significativa, portanto demonstrando a grande especificidade desta técnica.

6.

Pensa-se que os átomos de tecnécio se ligam ao conjugado através de pontes hidrazido ou diazenido:



em que

L representa um ligando de dioxigénio subordinado.

Exemplos deste tipo de ligação foram descritos para Mo e Re (Comprehensive Coordination Chemistry, vol. 2, G. Wilkinson, ed., Pergamon (Oxford)p. 130-151 1987) e diversos complexos análogos de ⁹⁹Tc têm sido preparados por reacção de um derivado de uma organo-hidrazina com uma espécie Tc (V)-oxo.

O esquema de marcação citado anteriormente tem sido utilizado para marcar IgG humano e policlonal e a região Fc de IgG humano. Os Tc- conjugados têm sido utilizados para a imagem de sítios focais de infecção num modelo murino. O esquema da marcação também tem sido utilizado para a marcação do fragmento E, (ver L.C. Knight et al; "J. Clin. Invest."; 72; 1983; p. 2007- 2013; que tem sido utilizado para a imagem de trombos numa experiência com o coelho relativamente à trombose das veias profundas

e ao anticorpo monoclonal 5E8.

Exemplos

Os dados provenientes da ressonância magnética nuclear e do infravermelho fornecidos nos exemplos obtiveram-se do seguinte modo:

Registaram-se os espectros de RMN protónica em um espectrómetro 80 MHz IBM AF-80. Todos os resultados dos espectros de RMN do protão foram registados em DMSO-d₆ a menos que indicado de outro modo. Os espectros de IV foram registados num espectrómetro de infravermelho Perkin-Elmer 598. Os espectros do RMN e IV foram coerentes com a estrutura designada.

Os nomes dos compostos em aspas, em seguida, no título dos compostos dos diversos exemplos estão conformes com a nomenclatura do Chemical Abstracts. Os esquemas reaccionais são ilustrados de acordo com os esquemas de 1 a 8 em anexo.

Exemplo 1

Preparação de cloridrato do cloridrato de 4-hidrazinobenzoato de succinimidilo

monocloridrato de 1-[(4-hidrazinobenzóil)-oxi]-2,5-pirrolidinodiona

Obteve-se ácido 4-hidrazinobenzóico, 2-(t-butoxicarboniloxi-imino)-2-fenilacetoneitrilo (BOC-ON), diciclo-hexilcarbodi-imida e N-hidroxissuccinimida da

Aldrich Chemicals (Milwaukee, WI).

Síntese do ácido 4-BOC-hidrazinobenzóico- A uma solução agitada de (1 equivalente) de ácido 4-hidrazinobenzóico e (3 equivalentes) de trietilamina em (5 mg/l) de dimetilformamida adicionou-se, gota a gota, uma solução de 1 equivalente de BOC-ON em dimetilformamida. Agitou-se a mistura reaccional à temperatura ambiente durante 3 horas. Em seguida, adicionou-se ácido clorídrico aquoso a 10% e subsequentemente a solução tornou-se turva. Extraíu-se a solução com acetato de etilo e os extractos orgânicos reunidos lavaram-se com água, secaram-se com sulfato de magnésio, filtraram-se e concentraram-se a pressão reduzida para se obter um sólido castanho. Recristalizou-se o sólido no seio de clorofórmio para se obter o produto pretendido sob a forma de um sólido castanho claro, rendimento 69%.
Análise: calculada para $C_{12} H_{16} N_2 O_4$:

C - 57,13; H - 6,39; N - 11,10.

Determ.: C - 57,02; H - 6,13; N - 11,61.

1H RMN δ : 1,45(s, 9H), 6,77(d, J_{ab} =8,6Hz, 2H), 7,85(d, J_{ab} =8,6Hz, 2H)

Síntese de 4-BOC-hidrazinobenzoato de succinimidilo

éster 2-[4-(2,5-dioxo-1-pirrolidinil)-oxilcarbonil]-7-fenil-7-1,1-dimetiletílico do ácido hidrazinocarboxílico.

A uma solução de (1 equivalente) do ácido 4-BOC-hidrazinobenzóico e (1 equivalente) de N-hidroxis-

succinimida em dioxano (10 ml/g do ácido) adicionou-se, gota a gota, uma solução de (1 equivalente) de diciclohexilcarbodi-imida em dioxano (5 ml/g). Agitou-se a mistura reaccional à temperatura ambiente durante 16 horas. Em seguida adicionaram-se (0,5 ml) de ácido acético e continuou-se a agitação durante 1 hora. Filtrou-se a mistura reaccional para eliminar a ureia que constituía um produto secundário. Concentrou-se o filtrado a pressão reduzida para se obter um sólido castanho que se tratou com éter dietílico, isolaram-se os produtos sólidos por filtração para se obter um sólido castanho claro, rendimento 86%.

Análise: calculada para $C_{16} H_{19} N_3 O_6$:

C - 55,01; H - 5,48; N - 12,03.

Determ: C - 55,17; H - 5,84; N - 11,86.

1H RMN δ : 1,47(s, 9H), 2,88(s, 4H), 6,85(d, $J_{ab}=8,9Hz$, 2H)
8,04(d, $J_{ab}=8,9Hz$, 2H)

Síntese do cloridrato de 4-hidrazinobenzoato de succinimidilo - A uma solução de cloreto de hidrogénio em dioxano (50 ml/g de éster, preparada fazendo borbulhar cloreto de hidrogénio em dioxano aproximadamente durante cinco minutos) adicionou-se 4-BOC-hidrazinobenzoato de succinimidilo (1 equivalente). Agitou-se a mistura reaccional à temperatura ambiente. A mistura reaccional não se apresentou homogénea, contudo a cor inicialmente castanho clara nas duas

horas seguintes transformou-se em cor de laranja. Filtrou-se a mistura reaccional e lavou-se com éter dietílico para se obter um sólido amarelo claro, rendimento 72%; P.F. 203,5° - 205° C.

Análise: calculada para $C_{11}H_{12}ClN_3O_4$:

C - 46,25; H - 4,23; Cl - 12,40; N - 14,71;

Determ: C - 46,74; H - 4,38; Cl - 12,24; N - 14,26.

1H RMN δ : 2,87(s,4H), 7,05(d,2H, J_{ab} =8,9Hz) 7,97(d,2H, J_{ab} =8,9Hz)

Exemplo 2

Preparação de cloridrato de 6-hidrazinopiridino-3-carboxilato de succinimidilo

1-[(6-hidrazino-3-piridinil)-carbonil]-oxi-monocloridrato de 2,5-pirrolidinodiona

Adquiriram-se em Aldrich Chemicals (Milwaukee, WI) o ácido 6-cloronicotínico, o dicarbonato de di-t-butilo e hidrato de hidrazina a 85%.

Síntese do ácido 6-hidrazinopiridino-3-carboxílico

Adicionaram-se (8,0g) de ácido 6-cloronicotínico a (35 ml) de hidrato de hidrazina a 85%. Colocou-se a mistura reaccional num banho de óleo à temperatura de 100° C durante 4 horas. A mistura reaccional homogênea concentrou-se até à secagem para se obter um sólido branco

que se dissolveu em água e após acidificação para pH 5,5 com ácido clorídrico concentrado formou um precipitado. Isolou-se o precipitado por filtração e lavou-se o sólido com etanol a 95% e com éter dietílico para se obter 6,0 g de um sólido castanho claro, rendimento 77% P.F. 292^o-293^oC.

Análise: calculada para C₆ H₇ N₃ O₂:

C - 47,06; H - 4,61; N - 27,44;

Determ: C - 46,83; H - 4,38; N - 27,27.

¹H RMN δ: 6,69(d, J=8,8Hz, 1H), 7,84(dd, J=2,4,8,8Hz, 1H),
8,51(d, J=2,4Hz, 1H)

Síntese do ácido 6-BOC-hidrazinopiridino-3-carboxílico

A uma solução de 1,4 g (9,8 mmole) do ácido 6-hidrazinopiridino-3-carboxílico em 1,2 ml (11,8 mmole) de trietilamina em (10 ml) de dimetilformamida adicionou-se 2,13 g (9,8 mmole) de dicarbonato de di-t-butilo. Após 1 hora de agitação a mistura reaccional tornou-se homogênea continuando-se a agitação durante 16 horas à temperatura ambiente. Concentrou-se a mistura reaccional até à secagem a pressão reduzida para se obter um sólido castanho. Dissolveu-se o resíduo numa quantidade mínima de acetato de etilo e filtrou-se através de gel de sílica 60 (230 - 400 malhas) utilizando acetato de etilo como eluente. Concentrou-se o eluente até à secagem. Utilizou-se o produto sem mais purificação.

^1H RMN δ : 1,40(s,9H), 6,52(d,J=8,8Hz,1H) 7,97(dd,J=2,4,8,8Hz,1H), 8,58(d,J=2,4Hz,1H)

Síntese de 6-BOC-hidrazinopiridino-3-carboxilato de succinimidilo

éster 2-[5-[[(2,5-dioxo-1-pirrolidinil)-oxicarbonil]-2-piridinil]-1,1-dimetiletilico] do ácido hidrazinocarboxílico

A uma solução de 1,45 g (5,75 mmole) de ácido 6-BOC-hidrazinopiridino-3-carboxílico e 0,66 g (5,75 mmole) de N-hidroxissuccinimida em (15 ml) de dimetilformamida, adicionou-se (5 ml) de uma solução de 1,18 g (5,75 mmole) de diciclo-hexilcarbodi-imida em dimetilformamida. A mistura reaccional turvou após 1 hora e continuou-se a agitação durante 16 horas à temperatura ambiente. Filtrou-se a mistura reaccional e concentrou-se o filtrado até à secagem para se obter um resíduo sólido castanho. Dissolveu-se o resíduo em uma quantidade mínima de acetato de etilo e filtrou-se através de gel de sílica 60 (230-400 malhas) utilizando acetato de etilo como eluente. Concentrou-se o eluente até à secagem para se obter um sólido amarelo claro que recristalizou no seio de acetato de etilo/hexano; rendimento 60% P.F. 169,5°- 172° C.

Análise: calculada para $C_{15}H_{18}N_4O_6$;

C - 51,43; H - 5,18; N - 15,99

Determ: C - 51,81; H - 5,26; N - 15,60.

1H RMN δ : 1,41(s,9H), 2,87(s,4H) 6,64(d,J=8,8Hz,1H) 8,08

(dd,J=2,4,8,8Hz) 8,73(d,J=2,4Hz,1H)

Síntese do cloridrato de 6-hidrazinopiridino-3-carboxilato de succinimidilo - Preparou-se uma solução de cloreto de hidrogénio em dioxano fazendo borbulhar cloreto de hidrogénio anidro em (20 ml) de dioxano a uma velocidade moderada durante 10 minutos. Dissolveram-se (100 mg) de 6-BOC-hidrazinopiridino-3-carboxilato de succinimidilo em (2ml) de dioxano e adicionaram-se (2 ml) de HCl/dioxano agitando-se a mistura reaccional à temperatura ambiente. Após 5 min., a solução turvou formando-se um precipitado. Agitou-se continuamente durante 4 horas. Filtrou-se a mistura reaccional turva para se obter 55 mg de um sólido branco; rendimento 67%.

Análise: calculada para $C_{10}H_{11}ClN_4O_4$;

C - 41,87; H - 3,87; Cl - 12,37; N - 19,53;

Determ: C - 41,92; H - 3,90; Cl - 12,30; N - 19,47;

1H RMN δ : 2,88(s,4H), 7,01(d,J=8,8Hz,1H) 8,19(dd,J=2,4,

8,8Hz,1H) 8,83(d,J=2,4Hz,1H)

Exemplo 3

Preparação do cloridrato de 4-hidraziodotereftalato de succinimidilo

monocloridrato da hidrazida 4-[(2,5-dioxo-1-pirrolidinil)-oxi]-carbonil do ácido benzóico.

Mono-metil tereftalato, cloreto de oxalilo, carbazato de t-butilo, diciclo-hexilcarbodi-imida (DCC) e N-hidroxissuccinimida (NHS) adquiridos de Aldrich Chemicals (Milwaukee, WI).

Síntese do cloreto de tereftalato de metilo - A uma solução agitada de tereftalato de mono-metilo (1 equivalente), tolueno (30 ml/g de éster) e 3 gotas de dimetilformamida (DMF), adicionou-se, gota a gota, (2 equivalentes) de cloreto de oxalilo. Agitou-se a mistura reaccional à temperatura de 45° C durante 16 horas. Concentrou-se a solução a pressão reduzida para se obter o produto desejado sob a forma de um sólido amarelo claro. Utilizou-se o produto sem mais purificação; rendimento 82% P.F. 50° - 52° C.

IV (em película fina); 2970, 1775, 1720, 1430, 1400, 1280, 1105, 880 cm⁻¹.

¹H RMN δ: 3,97(s,3H), 8,14(s,4H).

Síntese da 2-[1-(1,1-dimetiletoxi)-carbonil]-hidrazida do éster monometílico do 4-BOC-hidrazidotereftalato metílico do ácido 1,4-benzenodicarboxílico - A uma mistura agita

da fortemente de carbazato de t-butilo (1 equivalente), cloreto de metileno (20 ml/g) e (2,0 equivalentes) de carbonato de hidrogénio e sódio a 25%, adicionou-se, gota a gota, uma solução de cloreto de tereftalato de metilo (1 equivalente) em (40 ml/g) de cloreto de metileno. Agitou-se a mistura reaccional à temperatura de 20° C durante 30 minutos. Separaram-se as fases e extraíu-se a fase aquosa com cloreto de metileno. As fases orgânicas reunidas lavaram-se com ácido clorídrico a 10% e uma solução saturada de cloreto de sódio. Secou-se a fase orgânica com sulfato de magnésio, filtrou-se e concentrou-se para se obter um sólido branco; rendimento 91,7% P.F. 197° - 199° C. IV (KBr): 3010, 1720, 1670, 1430, 1270, 1220, 1130, 1100, 1030, 870, 750 cm⁻¹.

¹H RMN(CDCl₃): δ 1,49(s, 9H), 3,93(s, 3H), 7,83(d, J_{AB}=8Hz, 2H), 8,07(d, J_{AB}=8Hz, 2H).

Síntese do ácido 4-BOC-hidrazidotereftálico - A uma solução de 4-BOC-hidrazidotereftalato de metilo (1 equivalente) em (50 ml/g) de metanol, adicionou-se (10,0 equivalentes) de hidróxido de sódio. Agitou-se a reacção à temperatura ambiente durante 16 horas. Concentrou-se a mistura reaccional a pressão reduzida para se eliminar o metanol. Adicionou-se água e acidificou-se cuidadosamente a solução para um pH de 1,0. Extraíu-se a solução ácida com acetato de etilo e secaram-se os extractos orgânicos com sulfato de magnésio, filtraram-se até à secagem a pressão reduzi-

da para se obter um sólido branco; rendimento 87,5% P.F.
208° - 210° C.

^1H RMN δ : 1,41(s,9H), 7,97(d,J=2,4Hz,4H), 8,90(m,1H)
10,3(m,1H).

Síntese do éster 1,1-dimetiletilico de 2-[4-[2,5-di-
oxo-1-pirrolidinil)-oxi]-7-carbonil]-benzoil do ácido succi-
nimidil-4-BOC-hidrazidotereftalato-hidrazinocarboxílico-

A uma solução do ácido 4-BOC-hidrazidotereftálico (1 equi-
valente) e de N-hidroxissuccinimida (1 equivalente) em
dimetilformamida (10 ml/g) adicionou-se, gota a gota, uma
solução de DCC (1 equivalente) em DMF (5 ml/g). Agitou-se
a mistura reaccional à temperatura de 20° C durante 16
horas. Adicionaram-se em seguida (0,5 ml) de ácido acético
e manteve-se a agitação durante 1 hora. Filtrou-se a mistu-
ra reaccional para eliminar a ureia que constituía o pro-
duto secundário. Concentrou-se o filtrado a pressão redu-
zida para se obter um óleo castanho amarelado. Utilizou-
-se uma cromatografia rápida no vácuo para isolar o produ-
to com (hexano/acetato de etilo a (7:3)); rendimento 47,8%
P.F. 182° - 185° C. IV (KBr): 3330, 3230, 2990, 1770, 1740,
1660, 1530, 1500, 1370, 1280, 1200, 1150, 1070, 1000, 870,
790, 640 cm^{-1} .

^1H RMN (CDCl_3) δ : 1,50(s,9H), 2,91(s,4H), 6,70(m,1H),
7,91(d,J_{AB}=8,8Hz,2H), 8,20(d,J_{AB}=8,8Hz,
2H).

Análise: calculada para $C_{17} H_{19} N_3 O_7$:

C - 54,11; H - 5,07; N - 11,13;

Determ: C - 53,66; H - 5,15; N - 11,09.

Síntese do cloridrato de succinimidil-4-hidrazidoterefta-

lato - A uma solução de cloreto de hidrogénio em tetra-hidrofurano (50 ml/g, preparada fazendo borbulhar cloreto de hidrogénio em tetra-hidrofurano durante cerca de 10 minutos) adicionou-se 4-BOC-hidrazidotereftalato de succinimidilo (1 equivalente). Após 1 hora, a mistura reaccional tornou-se homogénea e, após 4 horas, formou-se um precipitado branco. Filtrou-se a mistura reaccional e lavou-se com éter dietílico para se obter o produto pretendido sob a forma de um sólido branco; rendimento 37,7% P.F. $278^{\circ} - 280^{\circ} C$. IV (KBr): 3400, 3200, 2800, 2600, 1770, 1730, 1690, 1530, 1490, 1290, 1240, 1070, 1000, 870, 730, 640, 610 cm^{-1} .

1H RMN δ : 2,91(s,4H), 8,11(d, $J_{AB}=8,8\text{Hz}$, 2H), 8,25(d, $J_{AB}=8,8\text{Hz}$, 2H).

Análise: calculada para $C_{12} H_{12} ClN_3 O_5$:

C - 45,95; H - 3,86; Cl - 11,30; N - 13,40;

Determ: C - 45,84; H - 3,91; Cl - 11,37; N - 13,33.

Exemplo 4

Preparação de monocloridrato de cloridrato de 7⁻1H-pirrolo-2,5-diona, 1-6(hidrazino-3-piridinil) de 5-maleimidil-2-hidrazinopiridina

Adquiriu-se à Aldrich Chemicals (Milwaukee, WI), 2-cloro-5-nitropiridina, hidrato de hidrazina, dicarbonato de di-terc-butilo, paládio sobre carvão a 10%, anidrido maleico, acetato de cobalto e anidrido acético.

Síntese de 2-hidrazino-5-nitropiridina - A uma solução agitada de hidrato de hidrazina (30,0 equivalentes), água (4 ml/g de piridina) e etanol (2 ml/g de piridina), adicionou-se 2-cloro-5-nitropiridina (1 equivalente). Agitou-se a mistura reaccional à temperatura de 20° C durante 16 horas (formando uma pasta verde muito espessa). Isolou-se o precipitado por filtração, lavou-se o sólido com metanol e a seguir com éter dietílico para se obter um sólido verde. Utilizou-se o produto sem outra purificação; rendimento 77,3%. P.F. 205° - 207° C. IV (KBr): 3340, 3200, 2980, 1670, 1605, 1580, 1485, 1420, 1330, 1300, 1120, 980, 830, 770 cm⁻¹.

¹H RMN δ : 4,64(s, largo 2H), 6,76(d, J=8,8Hz, 1H), 8,15(dd, J=2, 4,8,8Hz, 1H), 8,86(d, J=2,4Hz, 1H), 9,12,(m, 1H).

Análise: calculada para C₅ H₆ N₄ O₂:

C - 39,21; H - 3,39; N - 36,51;

Determ: C - 38,96; H - 3,92; N - 36,35.

Síntese de 2-(BOC-hidrazino)-5-nitropiridina - A uma solução agitada de 2-hidrazino-5-nitropiridina (1 equivalente), dimetilformamida (15 ml/g de piridina) e trietilamina (1,1 equivalentes), adicionou-se, gota a gota, uma solução de dicarbonato de di-terc-butil (1,0 equivalente) em dimetilformamida (4 ml/g de dicarbonato). Agitou-se a mistura reaccional à temperatura de 20° C durante 48 horas. Concentrou-se a mistura reaccional a pressão reduzida para se obter um óleo castanho amarelado. Utilizou-se uma cromatografia rápida no vácuo (hexano/acetato de etilo a (8:2)) para isolar o produto que recristalizou no seio de acetato de etilo/hexano; rendimento 63,4%. P.F. 135° - 137° C. IV (KBr): 3280, 2980, 1710, 1600, 1500, 1330, 1290, 1270, 1250, 1150, 1120, 1010, 830, 760, 650, 500, cm⁻¹.

¹H RMN δ: 1,41(s, 9H), 6,60(d, J_{AB}=8,8Hz, 1H), 8,28(dd, J=2,4, 8,8Hz, 1H), 8,93(d, J_{AB}=2,4Hz, 1H), 9,14(m, 1H), 9,56(m, 1H).

Análise: calculada para C₁₀ H₁₄ N₄ O₄:

C - 47,24; H - 5,55; N - 22,03;

Determ: C - 46,99; H - 5,50; N - 21,93.

Síntese de 2-(BOC-hidrazino)-5-amino-piridina - Num aparelho de hidrogenação de Parr, adicionou-se 2-BOC-hidrazino-5-nitropiridina (1 equivalente), a paládio sobre carvão a 10% (0,3g Pd/g de piridina) e etanol (100 ml/g de piridina). Hidrogenou-se a mistura reaccional a 50 psi H₂

durante 2 horas à temperatura ambiente num hidrogenador de Parr. Filtrou-se a mistura reaccional através de um filtro e lavou-se com etanol. Concentrou-se a solução verde amarelada a pressão reduzida para se obter um sólido amarelo claro. Recristalizou-se o produto no seio de etanol; rendimento 81,64%. P.F. 140° - 142° C. IV (KBr): 3360, 3200, 2980, 1650, 1635, 1580, 1490, 1390, 1360, 1300, 1260, 1160, 1020, 880, 860, 830, 750, 590, 530 cm^{-1} . ^1H RMN δ : 1,37(s,9H), 6,34(d,J=8,8Hz,1H), 6,89(dd,J=2,4,8,8Hz,1H), 7,14(m,1H), 7,49(d,J=2,4Hz,1H), 8,50(m,1H).

Análise: calculada para $\text{C}_{10} \text{H}_{16} \text{N}_4 \text{O}_2$:

C - 53,55; H - 7,19; N - 24,98;

Determ: C - 53,73; H - 7,21; N - 25,05.

Síntese do éster 2-[5-(2,5-di-hidro-2,5-dioxo-1H-pirrol-1-il)-2-piridinil]-1,1-dimetiletilico do ácido 2-BOC-hidrazino-5-maleimidilpiridino-[hidrazina-carboxílico]- A

uma solução agitada de 2-BOC-hidrazino-5-amino piridina (1 equivalente) em 50 ml/g de acetona adicionou-se anidrido maleico (1,1 equivalentes). Agitou-se a mistura reaccional à temperatura de 25° C durante 2 horas, adicionou-se anidrido acético (1,2 equivalentes), acetato de cobalto (0,007 equivalente) e trietilamina (0,3 equivalentes). Agitou-se a mistura reaccional à temperatura de 60° C

durante 2 horas. A reacção modificou-se para cor amarela clara, que se tornou amarelo escuro. Concentrou-se a mistura reaccional a pressão reduzida para se obter um óleo castanho amarelado. Aplicou-se cromatografia rápida em vácuo com hexano/acetato de etilo a (8:2) para se isolar o produto que recristalizou no seio de éter/hexano; rendimento 28,3%. P.F. 182° - 184° C. IV (KBr): 3400, 3300, 3100, 2990, 1700, 1610, 1500, 1410, 1360, 1320, 1270, 1210, 1150, 1050, 830, 750, 690 cm^{-1} .

^1H RMN δ : 1,39(s,9H), 6,58(d, $J=8,8\text{Hz}$, 1H), 7,14(s, 2H), 7,45
(dd, $J=2,4,8,8\text{Hz}$, 1H), 7,94(d, $J=2,4\text{Hz}$, 1H), 8,37(m, 1H)

Análise: calculada para $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_4$:

C - 55,26; H - 5,30; N - 18,41;

Determ: C - 55,14; H - 5,30; N - 18,33.

Síntese do cloridrato de 5-maleimidil-2-hidrazinopiridina-

Preparou-se uma solução de cloreto de hidrogénio em dioxano fazendo borbulhar cloreto de hidrogénio anidro em (50ml) de dioxano a uma velocidade moderada durante 10 minutos. Adicionou-se 200 mg de 2-(BOC-hidrazino)-5-maleimidilpiridina dissolvidos em (5 ml) de dioxano e de (10 ml) de HCl/dioxano, agitando-se a mistura reaccional à temperatura ambiente. Após 30 min. observou-se uma turvação da solução e formou-se um precipitado. Agitou-se a mistura reaccional à temperatura de 25° C durante um total de 5 horas. A pasta obtida filtrou-se e lavou-se com éter dietílico

para se obterem 50 mg de um sólido branco; rendimento 31,6%. P.F. 280° - 290° C. (com decomposição; de amarelo para castanho). IV (KBr): 3440, 3100, 2580, 1720, 1610, 1560, 1480, 1390, 1200, 1150, 830, 690 cm^{-1} .

^1H RMN δ : 7,0(d, J=8,8Hz, 1H), 7,19(s, 2H), 7,63(dd, J=2,4, 8,8Hz, 1H), 8,15(d, J=2,4Hz, 1H).

Espectro de massa: $m/z = 204$ (M-HCl) $^{+}$.

Exemplo 5

Preparação de γ -propanal, γ -5- γ - γ -(2,5-dioxo-1-pirrolidinil)-oxi- γ -carbonil- γ -2-piridinil- γ -hidrazona- γ de 2-(2propenil-hidrazona)-nicotinato de succinimídilo.

Preparou-se o ácido 6-hidrazinonicotínico como descrito anteriormente e adquiriu-se aldeído propiónico na Aldrich Chemicals (Milwaukee, WI).

Síntese de 2-(2-propenil-hidrazona)-nicotinato de succinimídilo - A uma suspensão de ácido 6-hidrazinonicotínico (1 equivalente) em dimetilformamida (40 ml/g) adicionou-se aldeído propiónico (3 equivalentes). Agitou-se a mistura reaccional à temperatura ambiente durante 1 hora. Se não se obteve homogeneidade, aqueceu-se cuidadosamente a mistura reaccional até à obtenção de uma mistura homogênea. Arrefeceu-se a mistura reaccional para a temperatura ambiente e adicionou-se uma solução de N-hidroxissuccinimida (1 equivalente) em dimetilformamida. Em seguida

adicionou-se, gota a gota, uma solução de DCC (1 equivalente) em DMF. Agitou-se a mistura reaccional durante 16 horas à temperatura ambiente. Formou-se um precipitado que se eliminou por filtração por sucção e concentraram-se os líquidos mãe até à secagem. Suspendeu-se o resíduo sólido castanho em acetato de etilo, agitou-se durante uma hora e filtrou-se. Formou um precipitado sólido castanho claro a partir da solução de acetato de etilo e isolou-se por filtração para se obter o produto desejado; rendimento 65%.

^1H RMN δ : 1,06(t,3H), 2,34(m,2H), 2,86(s,4H), 7,11(d,J=9,4Hz, 1H), 7,54(t,1H,J=4,9Hz), 8,10(dd,J=9,44,2,33Hz,1H), 8,72(d,J=2,33Hz,1H)

Análise: calculada para $\text{C}_{13} \text{H}_{14} \text{N}_4 \text{O}_4$:

C - 53,79; H - 4,86; N - 19,30;

Determ: C - 53,66; H - 4,89; N - 19,12.

Exemplo 6

Preparação de [propanal, [4-[[(2,5-dioxo-1-pirrolidinil)-
-oxi]-carbonil]-2-tiazolil]-hidrazona] de 2-(2-(1-propenil)-
-hidrazona)-tiazol-4-carboxilato de succinimidilo

Adquiriram-se a tiosemicarbazida e o ácido bromoláctico à Aldrich Chemicals (Milwaukee, WI).

Síntese da tiosemicarbazona do aldeidopropiônico - A uma solução de tiosemicarbazida (1 equivalente) e de aldeído propiônico (1,5 equivalentes) em metanol, adicionou-se algumas gotas de ácido acético glacial. Aqueceu-se a mistura à temperatura de refluxo durante 45 minutos. Concentrou-se a mistura reaccional num vaporizador rotativo formando-se um precipitado. Isolaram-se os sólidos por filtração, lavaram-se com éter dietílico e secaram-se no vácuo; rendimento 71%.

Síntese do bromidrato do ácido 2-(2-(1-propenil-hidrazona))-tiazol-4-carboxílico - A uma solução da tiosemicarbazona do aldeído propiônico (1 equivalente) em metanol, adicionou-se ácido bromoláctico (1 equivalente). Aqueceu-se a mistura reaccional à temperatura refluxo durante 1 hora, em seguida arrefeceu-se para a temperatura ambiente e eliminou-se o dissolvente num vaporizador rotativo. Triturou-se o sólido amarelo resultante no seio de metanol/éter dietílico isolando-se um sólido amarelo claro que se lavou com éter dietílico e se secou no vácuo.

^1H RMN δ : 1,00 (t, J=7,9Hz, 3H), 2,15 (m, 2H), 7,44 (t, J=4,9Hz).

Síntese de 2-(2-(1-propenil)-hidrazona)-tiazol-4-carboxilato de succinimidilo - A uma solução de ácido (1 equivalente), N-hidroxissuccinimida (1 equivalente) e trietilamina (1,5 equivalentes) em dimetilformamida, adicionou-se, gota a gota, uma solução de DCC (1 equivalente) em DMF. Agitou-se a mistura reaccional durante 16 horas à

temperatura ambiente. O precipitado formado retirou-se por filtração e concentraram-se os líquidos mãe até à secagem. Adicionou-se acetato de etilo ao resíduo e agitou-se durante 1 hora. Eliminaram-se os produtos insolúveis por filtração e concentrou-se o líquido-mãe até à secagem. Fez-se uma cromatografia rápida do produto utilizando hexano/acetato de etilo (1:2) como eluente, obtendo-se o produto pretendido sob a forma de um sólido quase branco; rendimento 35%.

^1H RMN δ : 1,08 (t, J=7,9Hz, 3H), 2,24 (m, 2H), 7,40 (t, J=4,9Hz, 1H),
8,11 (s, 1H).

Exemplo 7

Preparação de 2-(2-metiletienil-hidrazona)-tiazol-4-carboxilato de succinimidilo

Síntese do 2-(2-metiletienil-hidrazona)-tiazol-4-carboxilato de succinimidilo - Dissolveu-se bromidrato do ácido 2-(metiletienil-hidrazona)-4-tiazolcarboxílico (1 equivalente) (preparado de acordo com o método de H. Johne, D. Seifert, S. Johne e E. Bulka; "Pharmazie"; 33; 1978; p. 259) em (20 ml/g) de dimetilformamida. Adicionaram-se N-hidroxissuccinimida (1 equivalente) e trietilamina (1,5 equivalentes). À mistura homogénea adicionou-se uma solução de DCC (1 equivalente), gota a gota, durante 15 minutos. Agitou-se a mistura reaccional durante 16 horas à temperatura ambiente. Formou-se um precipitado que se eliminou por filtração e concentrou-se o líquido-mãe até

à secagem para se obter um sólido castanho alaranjado. Suspendeu-se o resíduo em acetato de etilo e agitou-se à temperatura ambiente durante 1 hora. Eliminaram-se os produtos insolúveis por filtração e concentrou-se o líquido mãe para se obter um sólido castanho. Trituraram-se os sólidos no seio de éter dietílico e re-isolaram-se por filtração para se obter um sólido castanho amarelado; rendimento 40%. Filtrou-se uma amostra do produto através de uma camada fina de gel de sílica utilizando acetato de etilo/hexano a 2:1 como eluente. Concentrou-se o eluído para se obter o produto desejado sob a forma de um sólido amarelo claro. P.F. 202° - 205° C (com decomposição).

¹H RMN δ: 1,92(s, 3H), 1,96(s, 3H), 2,86(s, 4H), 8,11(s, 1H).

Espectro de massa: m/z = 297 (M+1)⁺

Exemplo 8

Preparação de hemicloridrato de [hidrazinocarbotioamida,
N-[4-[[(2,5-dioxo-1-pirrolidinil)-oxi]-carbonil]-fenilo]
de hemicloridrato de 4-tiosemicarbazidobenzoato de succini-
midilo

Obteve-se o ácido 4-aminocarboxílico da Aldrich Chemicals (Milwaukee, WI).

Síntese do éster 2-[[(4-carboxifenil)-amino]-tioxometil]-
-1-(1,1-dimetiletílico) do ácido [hidrazinocarboxílico-
-ácido BOC-4-tiosemicarbazidobenzóico]- A uma solução do

ácido 4-isotiocianatobenzoico (1 equivalente) (preparado de acordo com o método de D. W. Browne e G. M. Dyson; "J. Chem. Soc."; 178 (1934)) e trietilamina (1,2 equivalentes) em dimetilformamida adicionou-se uma solução de carbazato de t-butil (1 equivalente). Agitou-se a mistura reaccional à temperatura ambiente durante 3 horas e em seguida concentrou-se até à secagem. Dissolveu-se o resíduo em acetato de etilo e lavou-se com ácido cítrico a 10% e uma solução saturada de cloreto de sódio. Secou-se a fase orgânica com sulfato de sódio, filtrou-se e concentrou-se para se obter o produto pretendido sob a forma de um sólido quase branco; rendimento 70%. P.F. 131° - 133° C (com decomposição).

^1H RMN δ : 1,42(s, 9H), 7,67(d, $J_{AB}=8,9\text{Hz}$, 2H),
7,87(d, $J_{AB}=8,9\text{Hz}$, 2H).

Síntese do [hidrazinocarboxílico, éster 2-[4-(2,5-
-dioxo-1-pirrolidinil)-oxil]-carbonil-fenil-amino-tioxo-
metil-1,1-dimetiletilico] do ácido hidrazinocarboxílico do
BOC-4-tiosemicarbazidobenzoato de succinimidilo - A uma
solução de ácido (1 equivalente) e de N-metilmorfolina (1,1 equivalentes) em acetonitrilo adicionou-se uma solução de carbonato de succinimidilo e tetracloroetilo (1 equivalente) em acetonitrilo. Agitou-se a mistura reaccional à temperatura ambiente durante 16 horas. Adicionou-se acetato de etilo à mistura reaccional e lavou-se a solução homogénea com ácido cítrico a 5% arrefecido, água arrefecida,

solução aquosa saturada arrefecida, água arrefecida e solução saturada de cloreto de sódio arrefecida. Secou-se a fase orgânica com sulfato de magnésio, filtrou-se e concentrou-se para se obter um óleo amarelo claro. Submeteu-se o óleo a cromatografia rápida em gel de sílica utilizando como eluente hexano/acetato de etilo. Isolou-se o produto sob a forma de um óleo amarelo que solidificou após adição de éter etílico. Retiraram-se os produtos sólidos por filtração para se obter o produto pretendido; rendimento 25%. P.F. 161° - 163° C.

^1H RMN δ : 1,52(s, 9H), 2,88(s, 4H), 7,74(d, $J_{AB}=10,0\text{Hz}$, 2H), 8,05(d, $J_{AB}=10,0\text{Hz}$, 2H).

Análise: calculada para $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{SO}_6$:

C - 49,99; H - 4,94; N - 13,72; S - 7,85;

Determ: C - 50,05; H - 4,95; N - 13,64; S - 7,95.

Síntese de hemicloridrato de 4-tiosemicarbazidobenzoato de succinimidilo - A uma suspensão de éster BOC-succinimídico em éter dietílico adicionou-se uma solução de ácido clorídrico anidro (g) em éter dietílico (preparado fazendo borbulhar ácido clorídrico gasoso em éter dietílico anidro). Agitou-se a suspensão à temperatura ambiente durante 16 horas. A mistura reaccional apresentou-se heterogênea durante todo o desenvolvimento da reacção. Isolaram-se os produtos sólidos por filtração para se obter o sal de cloridrato do produto pretendido; rendimento 80%. P.F. 155° - 160° C.

^1H RMN δ : 2,88(s,4H), 8,01(s,4H).

Análise: calculada para $\text{C}_{12} \text{H}_{13} \text{N}_4 \text{SO}_4 \cdot 0,5 \text{HCl}$:

C - 44,00; H - 4,15; N - 17,10 S - 9,79;

Determ: C - 44,56; H - 3,88; N - 17,04 S - 9,74.

Exemplo 9

Conjugação de IgG

A uma solução de 10 mg de IgG (peso molecular = 155.000), em 2 ml de tampão de fosfato de sódio 0,1M (pH 7,8), adicionaram-se 17,2 μl de cloridrato de 4-hidrazinobenzoato de succinimidilo 30 mM em dimetilformamida. Após agitação durante 5 horas, à temperatura ambiente, dialisou-se a mistura reaccional contra tampão de acetato de sódio 0,1 M (pH 5,2). Determinou-se o número de grupos hidrazino conjugados com a proteína pelo método de T. P. King et al ("Biochemistry"; 25; 1986; p. 5774). Resumidamente, o conjugado hidrazino- proteína reagiu com o aldeído 4-nitrobenzílico para converter os grupos hidrazino em hidrazonas. O número de moléculas hidrazona/proteína determinou-se por espectrofotometria utilizando a hidrazona do p-nitrofenilbenzaldeído e a fenil-hidrazina como padrão ($\lambda_{\text{max}} = 412$, $\epsilon = 2,41 \times 10^4$). Obteve-se na modificação um rendimento entre 25 a 35%.

Exemplo 10

Marcação de IgG conjugada com $^{99\text{m}}\text{Tc}$

Reconstituiu-se um Kit Dulont Tc-glucoscano

com 3 ml de água contendo 10 m Ci de $^{99m}\text{TcO}_4^-$. Misturaram-se 250 μl desta solução com 250 μl de 1-5 mg/ml de IgG conjugada em tampão de acetato de sódio 0,1 M (pH 5,2). Após incubação durante 1 hora à temperatura ambiente foi associada com a proteína uma actividade > 95% como se determinou por CLAR radiométrica (coluna TSK 3.000) e cromatografia rápida em camada fina (CRCF).

Injectaram-se 800 uCi de IgG marcada com Tc em ratos portadores de abscessos num membro posterior. Às 24 horas sacrificaram-se os ratos. Determinou-se a distribuição da radioactividade:

<u>Orgão</u>	<u>Dose injectada em %/g de tecido</u>
Sangue	1,36
Rim	1,11
Músculo infectado	0,76
Músculo normal	0,12
Fígado	0,81

Relação músculo infectado/músculo normal = 6,3

Exemplo 11

Conjugação do fragmento E₁

Concentrou-se a proteína (DD) E entre 5 a 10 mg/ml e modificou-se com 20 vezes um excesso molar de cloridrato de 6-hidrazinopiridina-3-carboxilato de succinimidilo em tampão de borato a 12,5 mM pH 8,5. Após incu-

bação durante 5 horas, (sob agitação suave), à temperatura de 4° C, dialisou-se a amostra durante aproximadamente 12 horas versus água não pura desgaseificada.

Separou-se o fragmento E_1 do complexo DD(E) modificado ajustando a amostra para 0,55 M em ácido acético e diluindo-se a 1:1 v/v com ureia 6M. Corrigiu-se o pH da amostra para 5,5 com hidróxido de sódio 10 N e dialisou-se a amostra contra tampão de citrato 10 mM de (pH 5,7) para eliminar o excesso de reagentes. Durante a diálise, a proteína DD precipitou deixando o fragmento modificado E_1 em solução. O precipitado de DD foi facilmente removido por centrifugação.

O E_1 modificado foi marcado com Tc - 99m através da reação com gluco-heptonato de Tc-99m como descrito anteriormente. O E_1 marcado com Tc 99m foi utilizado para visualizar um trombo numa experiência com um coelho (ver D. Collen et al.; "J. Clin. Invest."; 71; 1983; p. 368 - 376.

Exemplo 12

Conjugação do anticorpo monoclonal 5E8 (ver E.A. Chen et al; "Cancer Research"; 49; 1989; p. 3642 - 3649.

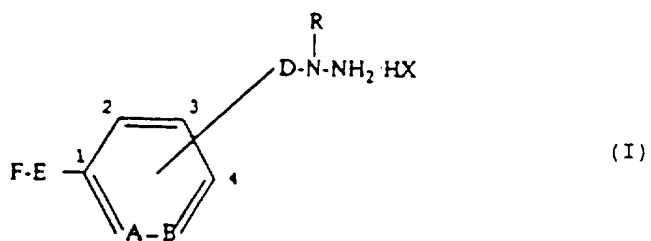
Modificou-se o anticorpo monoclonal 5E8 (a uma concentração entre 5 e 10 mg/ml) com um excesso de 14 vezes o cloridrato de 6-hidrazinopiridina-3-carboxilato de succinimidilo em tampão de borato 12,5 mM a pH 8,5, (durante 5 horas à temperatura ambiente). Dialisou-se o

anticorpo conjugado contra tampão de citrato 20 mM de (pH 5,2 100mM em cloreto de sódio). Após centrifugação para eliminar uma pequena quantidade de turvação, o grau de modificação, (determinado por espectrofotometria como descrito anteriormente), verificou-se ser de 6,5 grupos de hidrazina por molécula de proteína. A análise por ELISA e a imunocitoaderência não mostraram perda de imuno reactividade.

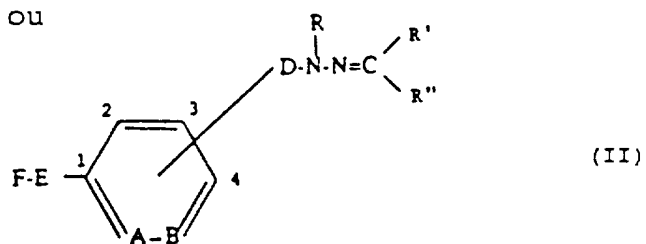
Os compostos específicos e os pormenores do método descrito anteriormente são exemplificativos e não se podem considerar como limite do âmbito da presente invenção.

REIVINDICAÇÕES

1.- Processo para a preparação de compostos de fórmula geral



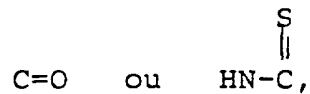
ou



em que

A e B representam, cada um, um átomo de carbono ou de azoto,

D representa uma ligação directa ou um grupo CH_2 ,



E representa um grupo C=O ou forma, considerado conjuntamente com F, um grupo maleimidilo,

F representa um grupo facilmente substituível por uma amina primária em meio aquoso alcalino ou neutro quando E representa um grupo C=O ou forma, considerado conjuntamente com E, um grupo maleimidilo,

R representa um átomo de hidrogénio ou um grupo alquilo inferior,

R' e R'', iguais ou diferentes, representam, cada um, um átomo de hidrogénio ou um grupo alquilo inferior, e

X representa um ião positivo,

caracterizado pelo facto de se preparar um composto que contém um grupo hidrazino/hidrazido protegido por um grupo protector lábil ácido como, por exemplo, um grupo t-butoxicarbonilo ou, eventualmente, um grupo hidrazino/hidrazido protegido sob a forma de uma alquil (inferior)-hidrazona e um grupo capaz de reagir com proteínas como, por exemplo, um éster activo, uma amida activa ou um grupo maleimido e de se eliminar, depois, o grupo protector, citado antes, em meio ácido anidro para se obter um composto em que o grupo capaz de reagir com as proteínas mantém-se inalterado

e o grupo hidrazino/hidrazido, que ainda não reagiu, mantém-se sob a forma protonada.

2.- Processo de acordo com a reivindicação 1, para a preparação de compostos de fórmula geral I ou II em que D representa uma ligação directa à posição 4 do núcleo, caracterizado pelo facto de se utilizar compostos iniciais correspondentemente substituídos.

3.- Processo de acordo com a reivindicação 1, para a preparação de compostos de fórmula geral I ou II em que E representa um grupo carbonilo, F representa um grupo N-oxisuccinimidilo, tetrafluorofenolato, N-oxibenzotriazol e imidazolato e X representa um halogeneto, nitrato, trifluoroacetato, tetrafluoroborato e sulfato, caracterizado pelo facto de se utilizar compostos iniciais correspondentemente substituídos.

4.- Processo de acordo com a reivindicação 2, para a preparação de compostos de fórmula geral I ou II em que R representa um átomo de hidrogénio ou um grupo metilo, E representa um grupo carbonilo, F representa um grupo N-oxisuccinimidilo e X representa um átomo de cloro, caracterizado pelo facto de se utilizar compostos iniciais correspondentemente substituídos.

5.- Processo de acordo com a reivindicação 4, para a prepa-

ração de compostos de fórmula geral I ou II em que A e B representam, cada um, um átomo de carbono ou um dos símbolos A e B representa um átomo de carbono e o outro representa um átomo de azoto, caracterizado pelo facto de se utilizar compostos iniciais correspondentemente substituídos.

6.- Processo de acordo com a reivindicação 4, para a preparação de compostos de fórmula geral I ou II em que A representa um átomo de carbono, B representa um átomo de azoto e R representa um átomo de hidrogénio, caracterizado pelo facto de se utilizar compostos iniciais correspondentemente substituídos.

7.- Processo de acordo com a reivindicação 4, para a preparação de compostos de fórmula geral I ou II em que A e B representam, cada um, um átomo de azoto e R representa um átomo de hidrogénio, caracterizado pelo facto de se utilizar compostos iniciais correspondentemente substituídos.

8.- Processo de acordo com a reivindicação 1, para a preparação de compostos de fórmula geral I ou II em que D, ligado à posição 4 do núcleo, representa um grupo $C=O$, CH_2 ou $NH-\overset{\overset{S}{\parallel}}{C}-$, isto é, tioamida, caracterizado pelo facto de se utilizar compostos iniciais correspondentemente substituídos.

9.- Processo de acordo com a reivindicação 8, para a prepa-

ração de compostos de fórmula geral I ou II em que D representa um grupo C=O ou tioamida, caracterizado pelo facto de se utilizar compostos iniciais correspondentemente substituídos.

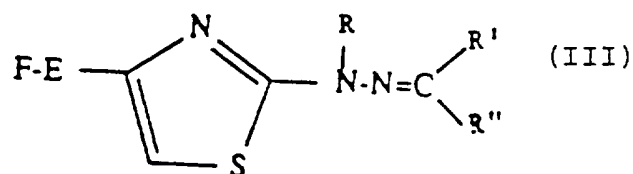
10.- Processo de acordo com a reivindicação 9, para a preparação de compostos de fórmula geral I ou II em que E representa um grupo C=O F representa um grupo N-oxisuccinimidilo, tetrafluorofenolato, N-oxibenzotriazol e imidazolato e X representa um halogeneto, nitrato, trifluoroacetato, tetrafluoroborato e sulfato, caracterizado pelo facto de se utilizar compostos iniciais correspondentemente substituídos.

11.- Processo de acordo com a reivindicação 8, para a preparação de compostos de fórmula geral I ou II em que D e E representam, cada um, um grupo carbonilo, F representa um grupo N-oxisuccinimidilo e X representa um átomo de cloro, caracterizado pelo facto de se utilizar compostos iniciais correspondentemente substituídos.

12.- Processo de acordo com a reivindicação 8, para a preparação de compostos de fórmula geral I ou II em que D representa um grupo tioamida, E representa um grupo carbonilo, F representa um grupo N-oxisuccinimidilo e X representa um átomo de cloro, caracterizado pelo facto de se utilizar compostos iniciais correspondentemente substituídos.

13.- Processo de acordo com a reivindicação 2, para a preparação de compostos de fórmula geral I ou II em que E representa um grupo carbonilo, F representa um grupo N-oxisuccinimidilo, A representa um átomo de carbono, B representa um átomo de azoto, R e R' representam, cada um, um átomo de hidrogênio e R" representa um grupo etilo, caracterizado pelo facto de se utilizar com postos iniciais correspondentemente substituídos.

14.- Processo para a preparação de compostos de fórmula geral



na qual

F, E, R, R' e R" têm os significados definidos antes na reivindicação 1,

caracterizado pelo facto de se fazer reagir um ácido 2- $\int$ alquil(inferior)-hidrazona $\int$ -4-tiazolcarboxílico dissolvido em dimetilformamida com N-hidroxisuccinimida na presença de trietilamina e diciclo-hexilcarbodiimida.

15.- Processo de acordo com a reivindicação 14, para a preparação de compostos de fórmula geral III na qual E representa um grupo carbonilo, F representa um grupo N-oxisuccinimidilo, R' re-

presenta um átomo de hidrogênio e R" representa um grupo etilo, caracterizado pelo facto de se utilizar compostos iniciais correspondentemente substituídos.

16.- Processo de acordo com a reivindicação 15, para a preparação de compostos de fórmula geral III na qual E representa um grupo carbonilo, F representa um grupo N-oxisuccinimidilo e R' e R" representam, cada um, um grupo metilo, caracterizado pelo facto de se utilizar compostos iniciais correspondentemente substituídos.

17.- Processo para a preparação de conjugados contendo grupos hidrazino/hidrazido livres, caracterizado pelo facto de se fazer reagir, em meio neutro ou ligeiramente alcalino, de preferência a um pH compreendido entre aproximadamente 7 e 8,5, os grupos nucleofílicos de uma macromolécula como, por exemplo, uma proteína, um polipeptido ou uma glicoproteína com um composto bifuncional preparado de acordo com o processo descrito na reivindicação 1 e comportando uma função capaz de reagir com essa macromolécula, isto é, uma função (a) hidrazino/hidrazida protonada ou (b) hidrazona e de se formar, neste último caso, o grupo hidrazino/hidrazido livre por diálise no seio de um tampão ácido de pH 5,6.

18.- Processo de acordo com a reivindicação 17, caracteri-

zado pelo facto de se utilizar como macromolécula uma imunoglobulina ou um seu fragmento.

19.- Processo para a preparação de macromoléculas marcadas constituídas por um ião metálico e por um conjugado preparado de acordo com o processo descrito na reivindicação 17, caracterizado pelo facto de se fazer reagir um metal apropriado com um conjugado constituído por, pelo menos, uma macromolécula e um composto comportando, pelo menos, um grupo hidrazino ou hidrazido livre, em condições suficientes para induzir a marcação.

20.- Processo de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo facto de se utilizar como ião metálico um ião de tecnécio ou um ião de rádio.

21.- Processo de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo facto de se utilizar como macromolécula uma imunoglobulina ou um seu fragmento.

22.- Processo de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo facto de se utilizar um conjugado que se obtém fazendo reagir, pelo menos, uma macromolécula e um composto com, pelo menos, um grupo hidrazino ou hidrazido livre em condições suficientes para induzir a reacção.

23.- Processo de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo facto de se utilizar como ião metálico um ião de tecnésio reduzido.

24.- Processo de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo facto de se utilizar um ião de tecnésio reduzido que se obtém fazendo reagir um ião TcO_4^- com um agente redutor na presença de um ligando de oxigénio que actua como quelante.

25.- Processo de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo facto de se utilizar um ligando de oxigénio que actua como quelante escolhido de entre um grupo gluco-heptonato, gluconato, 2-hidroxiisobutirato, lactato e 4,5-di-hidroxi-1,3-benzenodissulfonato.

26.- Processo de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo facto de se utilizar como agente redutor um ião estanoso.

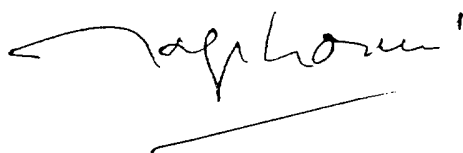
27.- Processo de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo facto de se utilizar como macromolécula uma imunoglobulina e como composto que contém, pelo menos, um grupo hidrazino ou hidrazido um composto escolhido de entre cloridrato de 4-hidrazinobenzoato de succinimidilo, cloridrato de 6-hidrazinopiridino-3-carboxilato de succinimidilo, 2-(2-propenil-hidrazona)-

-nicotinato de succinimidilo e hemicloridrato de 4-tiosemicarbazidobenzoato de succinimidilo.

28.- Processo de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo facto de se utilizar como ião metálico um ião de rênio reduzido.

29.- Processo para a preparação de macromoléculas marcadas com iões metálicos caracterizado pelo facto de se fazer reagir um metal apropriado com um conjugado preparado pelo processo de acordo com a reivindicação 18, em condições suficientes para induzir a marcação,

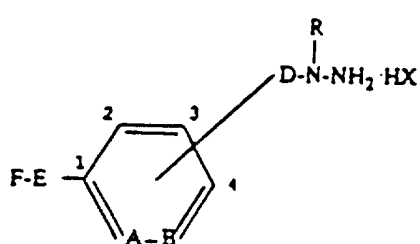
Lisboa, 23 de Fevereiro de 1990
O Agente Oficial da Propriedade Industrial



R E S U M O =====

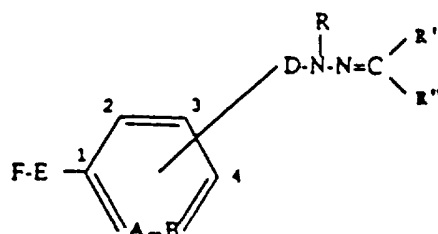
"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE COMPOSTOS AROMÁTICOS BIFUNCIONAIS, DE CONJUGADOS QUE OS CONTÊM E DE MACROMOLÉCULAS MARCADAS COM IÕES METÁLICOS"

Descreve-se um processo para a preparação de compostos de fórmula geral



(I)

ou



(II)

que consiste em preparar um composto que contém um grupo hidrazino/hidrazido protegido e um grupo capaz de reagir com proteínas e em eliminar, depois, o grupo protector em meio ácido anidro para se obter um composto em que o grupo capaz de reagir com as proteínas mantém-se inalterado e o grupo hidrazino/hidrazido, que ainda não reagiu, mantém-se sob a forma protonada.

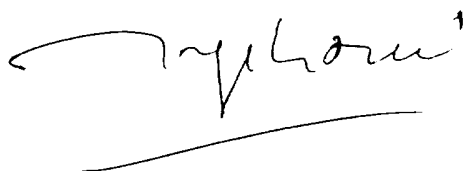
Descreve-se também um processo para a preparação de conjugados dos compostos bifuncionais, citados antes, com macromolé-

culas que consiste em fazer reagir, em meio neutro ou ligeiramente alcalino, os grupos nucleofílicos de uma macromolécula com um desses compostos bifuncionais.

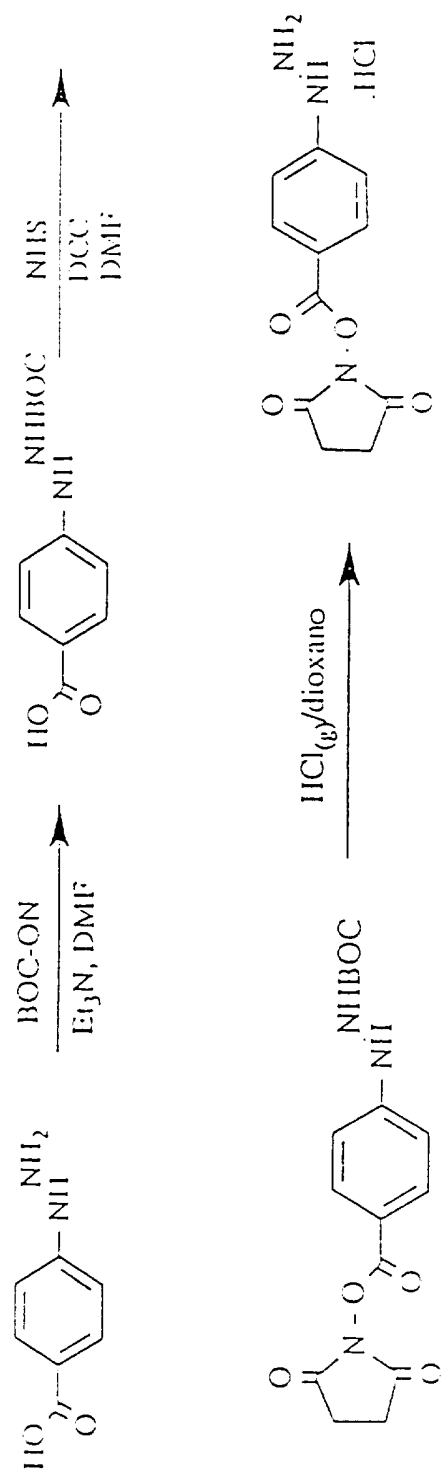
Descreve-se finalmente um processo para a preparação de macromoléculas marcadas constituídas por um ião metálico e por um conjugado, citado antes, que consiste em fazer reagir um metal apropriado com um desses conjugados, em condições suficientes para induzir a marcação.

Estas macromoléculas marcadas, que são particularmente úteis em biologia e em medicina, utilizam-se em radiologia e/ou terapêutica.

Lisboa, 23 de Fevereiro de 1990
O Agente Oficial da Propriedade da Invenção

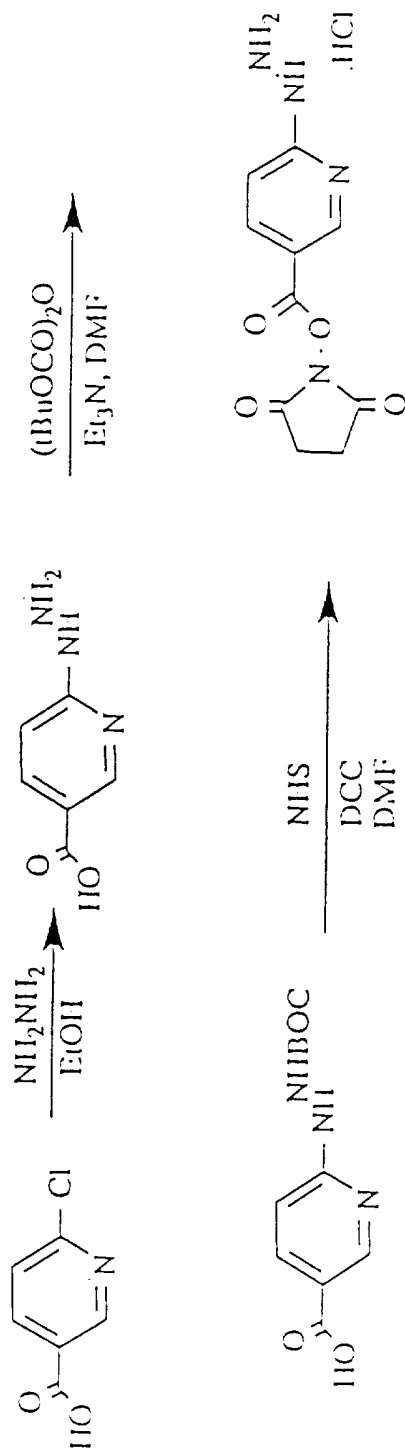


ESQUEMA 1: SÍNTESE DE CLORIDATO DE 4-HÍDRAZINOBENZATO DE SUCCINIMÍDIO



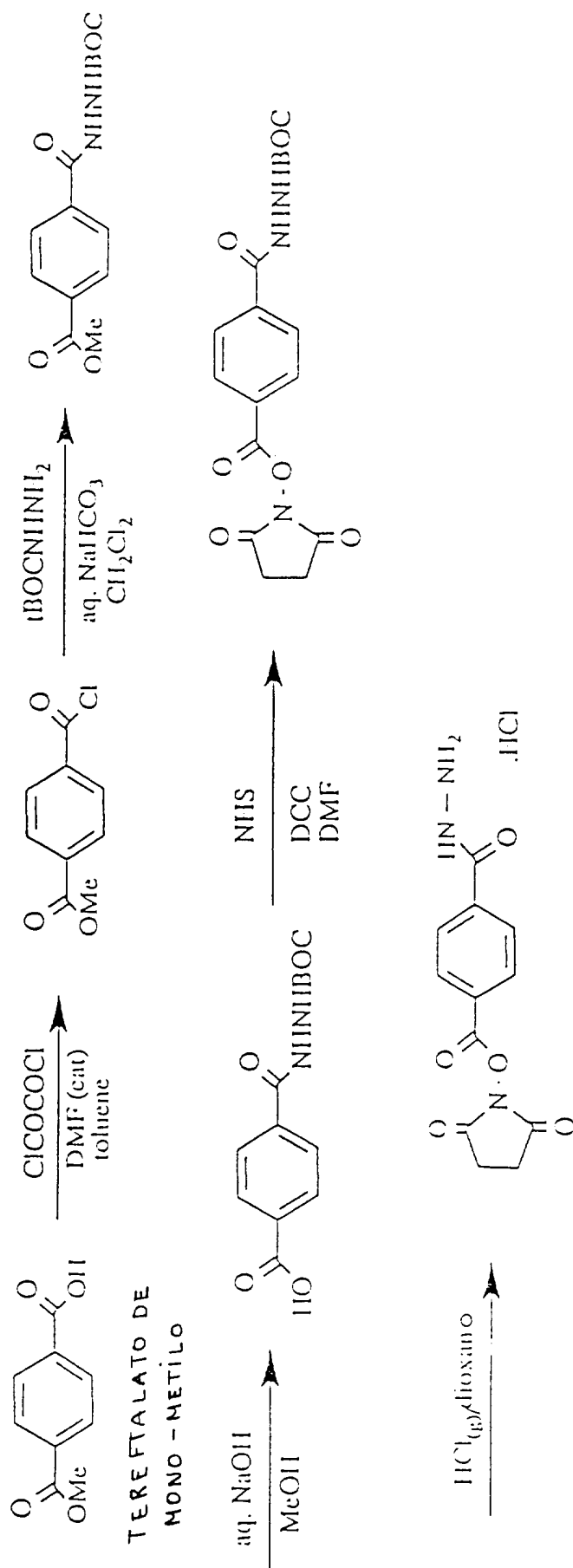
Handwritten mark.

ESQUEMA 2: SÍNTESE DE CLORIDATO DE 6-HÍDRAZINOPÍRIDINA-3-CARBOXILATO
DE SUCCINIMÍDIO



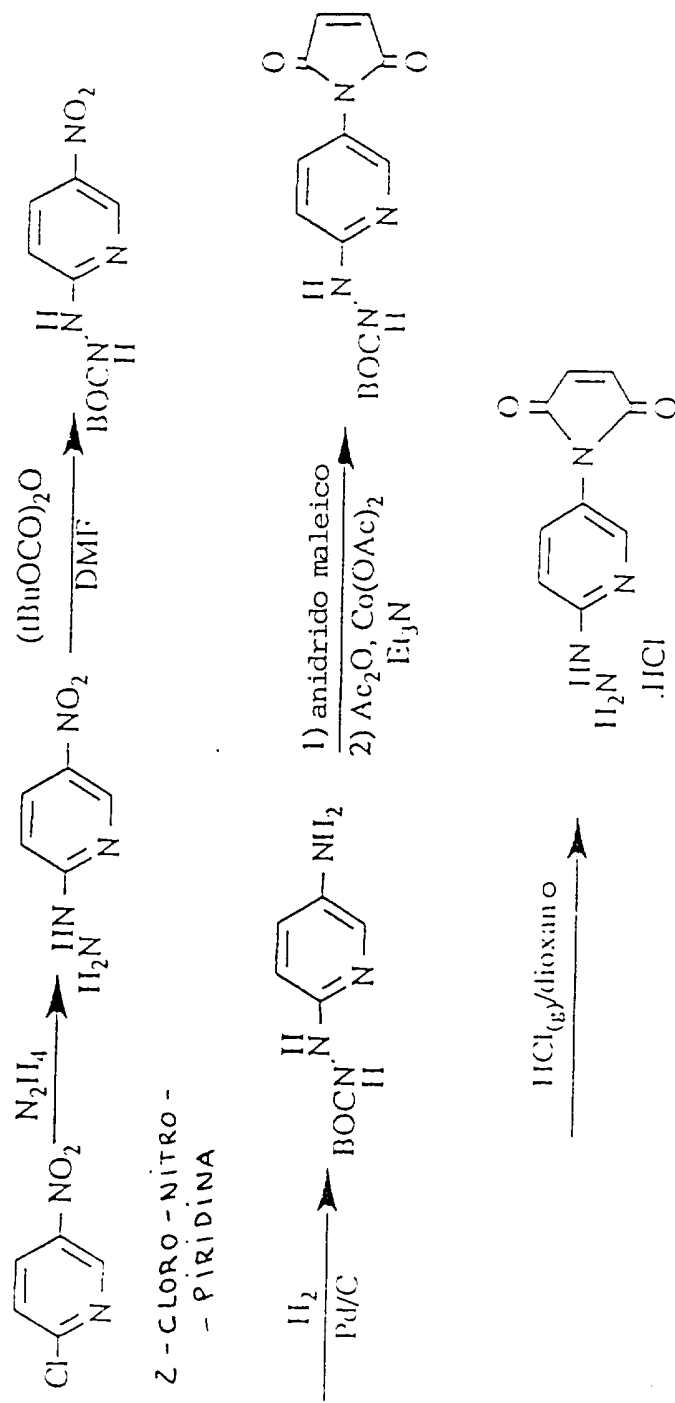
2

ESQUEMA 3: SÍNTESE DE CLORIDATO DE 4-HIDRAZIDOTEREFTALATO DE SUCCINIMÍDIO



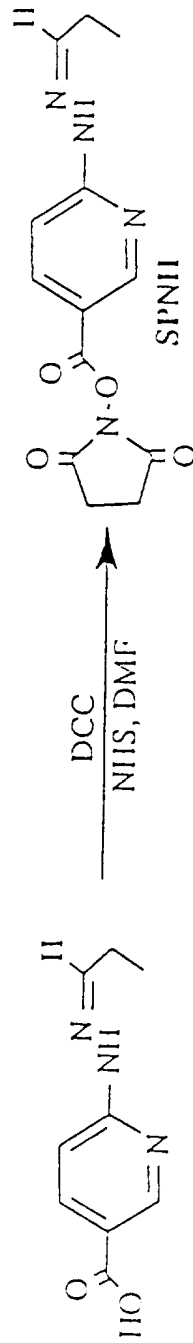
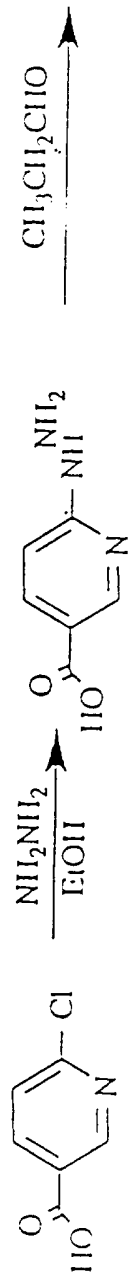
5

ESQUEMA 4: SÍNTESIS DE CLORIDRATO 5-HALEIMIDIL-2-HIDRAZINOPIRIDINA



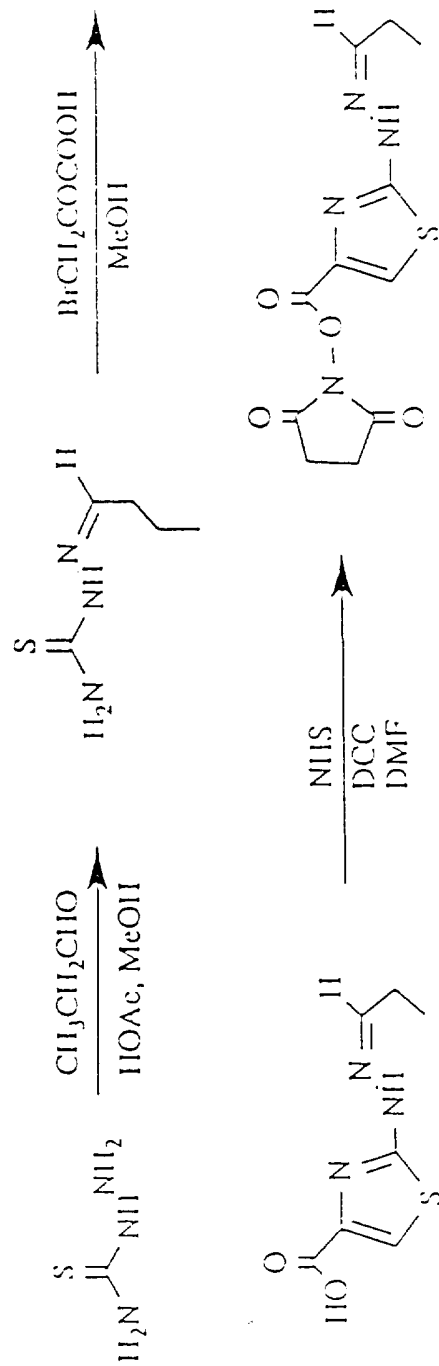
5

ESQUEMA 5 : Síntese de 2-(2-propenil-hidrazona)-nicotinato de succinimidilo



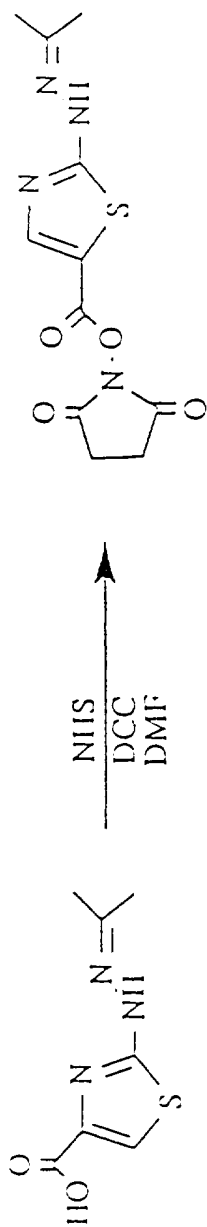
Handwritten signature or mark.

Esquema 6: Síntese de 2-[2-(1-propenil)-hidrazina]-tiázolo-4-carboxilato de succinimidilo



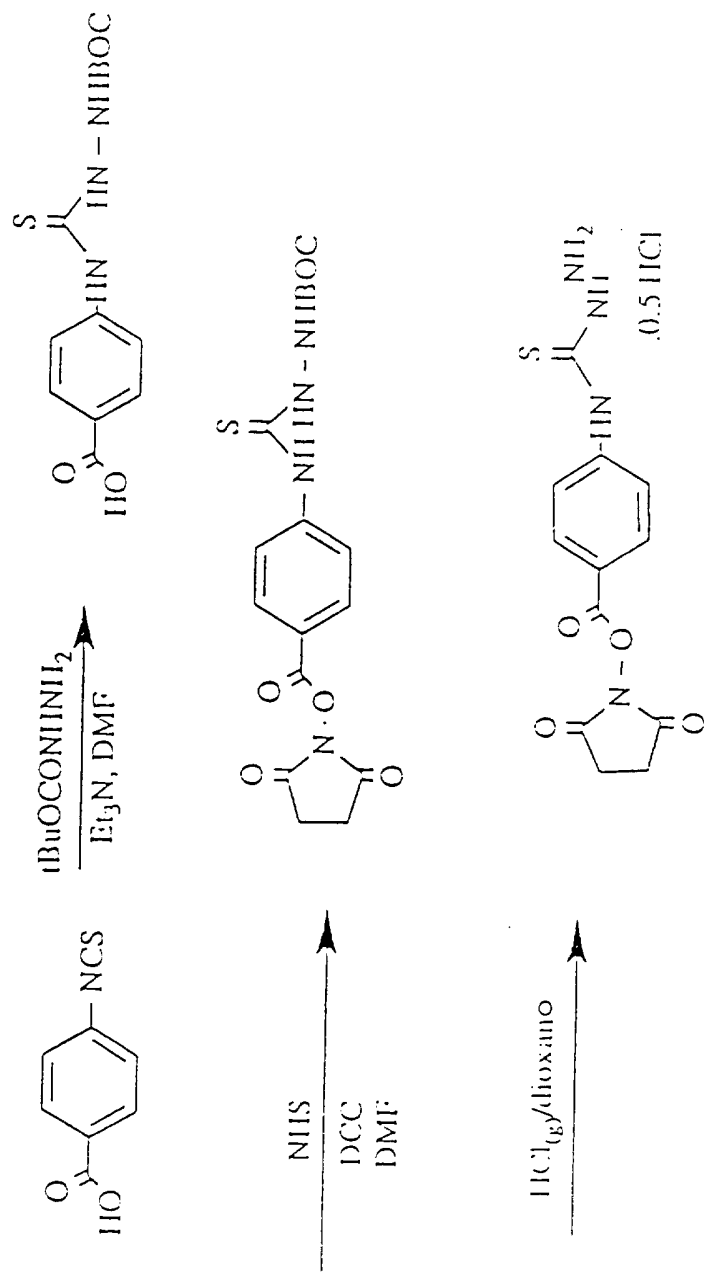
5

Esquema 7: Síntese de 2-(2-metiletenil-hidrazona)-tiapolo-4-carboxilato de succinimidilo



7.

Esquema 8: Síntese de 4-tiosemicarbagidobenzato de succinimidilo (hemiclorigato)



5