

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 895141 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **895141**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification

C07C233/54

C07C229/16

C07C229/42

C07C233/43

C07C255/25

C07C331/28

C07F 5/00

A61K 43/00

A61K 49/00

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **30.10.1989**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **30.10.1989**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **01.05.1990**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **12.06.2019**

(32) (33) (31) Etuokeus - Prioritet - Priority

31.10.1988 US 265158 P

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •Dow Global Technologies Inc., Washington Street, 1790 Building, Midland, MI 48674, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Wilson, David A., Richwood, TX 77531, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

2 •Garlich, Joseph R., Lake Jackson, TX 77566, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

3 •Frank, Richard Keith, Lake Jackson, TX 77566, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

4 •McMillan, Kenneth, Richwood, TX 77531, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

5 •Simon, Jaime, Angleton, TX 77515, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Kelatoivia aineita, jotka liittävät ligandin orto-asemaan, ja niiden komplekseja

Kelatmedel med orto-ligerande funktionalitet och deras komplexer

Kelatoivia aineita, jotka liittävät ligandin orto-asemaan, ja niiden komplekseja

5 Tämä keksintö koskee kelaatinmuodostajia, joissa ligeeraavat funktionaaliset atomit ovat orto-asemassa, niiden komplekseja ja konjugaatteja, menetelmiä niiden valmistamiseksi, formuloita niiden käyttämiseksi ja menetelmiä niiden käyttämiseksi syövän diagnosoinnissa ja/tai hoidossa.

10 Funktionaalisia ryhmiä sisältäviä kelaatinmuodostajia eli bifunktionaalisia koordinoituvia ryhmiä voidaan tunnetusti liittää kovalenttisesti vasta-aineeseen, joka on spesifinen syöpä- tai kasvainsolujen epitooppien tai antigeenien suhteen. Tällaisten vasta-aine-kelaatinmuodostajakonjugaattien radionuklidikomplekstit ovat käyttökel-

15 poisia diagnostisissa ja/tai terapeuttisissa käyttötarkoituksissa välineinä radionuklidin kuljettamiseksi syöpä- tai kasvainsoluun. Katso esimerkiksi Meares et al., Anal. Biochem. 142 (1984) 68 - 78; Krejcarek et al., Biochem. and Biophys. Res. Comm. 77 (1977) 581 - 585.

Kelaatteja muodostavia aminokarboksyylihappoja on tunnettu ja kuvattu kirjallisuudessa usean vuoden ajan. Tyypillisiä aminokarboksyylihappoja ovat nitrilotrietikkahappo (NTA), etyleenidiamiinitetraetikkahappo (EDTA),

25 hydroksietyylietyleenidiamiinitrietikkahappo (HEDTA), di-etyleenitriamiinipentaetikkahappo (DTPA) ja trans-1,2-di-aminosykloheksaanitetraetikkahappo (CDTA).

On ehdotettu ja valmistettu lukuisia bifunktionaalisia aminokarboksyylihappoihin perustuvia kelaatinmuodostajia. Kirjallisuudessa on kuvattu esimerkiksi DTPA:n syklistä dianhydridiä [Hnatowich et al., Science 220 (1983) 613 - 615; US-patenttijulkaisu 4 479 930] ja DTPA:n kar-

30 boksyyli-hiilihapposeka-anhydridejä (Gansow, US-patenttijulkaisut 4 454 106 ja 4 472 509; Krejcarek et al., Biochem. and Biophys. Res. Comm. 77 (1977) 581 - 585]. Kun

35

näitä anhydridejä kytketään muodostumisen kautta, jolloin jäljelle jää neljä dietyleenitriamiini(DETA-)rungan viidestä alkuperäisestä karboksimeytyyliryhmästä [Hnatowich et al., Int. J. Appl. Isot. 33 (1982) 327 - 332]. US-patenttijulkaisuissa 4 432 907 ja 4 352 751 esitetään lisäksi bifunktionaalisia kelaatinmuodostajia, joita voidaan käyttää sitomaan metalli-ioneja "orgaanisiin spesieksiin, kuten orgaanisiin kohdemolekyyleihin tai vasta-aineisiin". Kuten edellä, kytkeytyminen saadaan aikaan amidiryhmän kautta käyttämällä diaminotetraetikkahappodianhydridejä. Esimerkkeihin anhydrideistä kuuluvat EDTA:n, CDTA:n, propyleenidiamiinitetraetikkahapon ja fenyleeni-1,2-diamiinitetraetikkahapon dianhydridit. Uudemmassa US-patenttijulkaisussa 4 647 447 esitetään muutamia kompleksoituvan hapon anionista muodostettuja kompleksisuoloja käytettäväksi erilaisissa diagnoosimenetelmissä. Julkaisuissa kuvataan kompleksoituvan hapon karboksyyli-ryhmän kautta tapahtuvaa konjugaatiota, jolloin saadaan aikaan kytkeytyminen amidi-sidoksen kautta.

Kirjallisuudessa on kuvattu paljon myös erästä toista ryhmää aminokarboksyylihapojen funktionaaliseen ryhmään perustuvia bifunktionaalisia kelatoivia aineita. Niinpä Sundberg et al., [J. of Med. Chem. 17 (1974, nro 12) 1204] esittävät bifunktionaalisia EDTA-analogeja. Näitä yhdisteitä edustavat 1-(p-nitrofenyyli)etyleenidiamiinitetraetikkahappo, 1-(p-aminofenyyli)etyleenidiamiinitetraetikkahappo ja 1-(p-bentseenidiatsonium)etyleenidiamiinitetraetikkahappo. Julkaisussa käsitellään liittämistä proteiineihin para-substituentin kautta ja radioaktiivisten metalli-ionien sitomista kelaatinmuodostajaryhmään. Näitä yhdisteitä esitetään myös julkaisussa Biocem. Biophys. Res. Comm. 75 (1977, nro 1) 149 ja US-patenttijulkaisuissa 3 994 966 ja 4 043 998. On tärkeää huomata, että aromaattisen ryhmän liittäminen EDTA-rakenteeseen tapahtuu etyleenidiamiinirungon hiilen kautta. US-patent-

tijulkaisussa 4 662 420 esitetään EDTA-, HEDTA- ja DTPA-pohjaisia optisesti aktiivisia bifunktionaalisia kelaatinmuodostajia. Myös tämän julkaisun mukaan funktionaalisen aminokarboksyylihapporyhmän liittäminen bifunktionaaliseen kelaatinmuodostajamolekyyliin tapahtuu etyleenidi-
 5 amiinirungon hiilen kautta. Näissä yhdisteissä alkyleeniryhmä kytkee aromaattisen ryhmän (joka sisältää proteiiniin liittyvän funktionaalisen ryhmän) kelaatin muodostavan funktionaalisen ryhmän sisältävän polyamiinin hiilen.
 10 leen. Muita viittauksia tällaisiin yhdisteisiin on julkaisussa Brechbiel et al., Inorg. Chem. 25 (1986) 2772 - 2781, US-patenttijulkaisussa 4 467 447 ja PCT-hakemusjulkaisussa WO 86/06384. Myöhemmin on US-patenttijulkaisussa 4 678 667 esitetty tiettyjä makrosyklisiä bifunktionaalisia kelaatinmuodostajia ja niiden kuparikelaattikon-
 15 jugaattien käyttöä diagnostisiin ja terapeuttisiin sovelutuksiin. Funktionaalisen aminokarboksyylihapporyhmän sitominen bifunktionaaliseen kelaatinmuodostajamolekyyliin tapahtuu syklisen polyamiinirungon
 20 hiilen kautta. Niinpä kytkijä, joka liitetään toisesta päästään syklisen polyamiinin rengashiileen, liitetään toisesta päästään proteiinin kanssa reagoivaan funktionaaliseen ryhmään.

Eräs toinen, myös mainitsemisen arvoinen ryhmä bifunktionaalisia kelaatinmuodostajia koostuu yhdisteistä, joissa molekyylin kelatoituva ryhmä, ts. aminokarboksyylihappo, liittyy typen kautta molekyyliin, joka sisältää proteiinin kanssa reagoimaan pystyvän ryhmittymän, funktionaaliseen ryhmään. Esimerkkinä mainittakoon Mikolan
 25 et al. PCT-hakemusjulkaisussa WO 84/03698 (27.9.1984) esittämä bifunktionaalinen kelaatinmuodostaja, joka valmistetaan saattamalla p-nitrobentsyylibromidi reagoimaan DETA:n kanssa, jota reaktio seuraa reaktio bromietikkahapon kanssa, jolloin muodostuu aminokarboksyylihappo.
 30 Nitrori-ryhmä pelkistetään vastaavaksi amiiniryhmäksi ja muu-
 35

tetaan tämä sitten isotiosyanaattiryhmäksi reaktiolla tiofosfeenin kanssa. Nämä yhdisteet ovat bifunktionaalisia kelaatinmuodostajia, joita voidaan kytkeä bio-orgaanisiin molekyyliin käytettäväksi diagnostisina aineina, joilla on kyky kelatoida lantanideja. Koska molekyylin kyt-

5 kijäosan liittyminen tapahtuu aminokarboksyylihapon yhden typen kautta, menetetään yksi kelaation kannalta mahdollinen aminokarboksyyli-ryhmä. Niinpä valmistetaan DETA-pohjainen bifunktionaalinen kelaatinmuodostaja, joka sisältää

10 neljä (eikä viittä) happoryhmää. Tässä suhteessa tämä bifunktionaalisten kelaatinmuodostajien ryhmä on samankaltainen kuin ryhmä, jossa liittyminen proteiiniin tapahtuu amidiryhmän kautta, josta seuraa karboksyylikelaattiryhmä.

Palk et al. [J. Radioanalytical Chem. 57 (198, nro

15 12) 553 - 564] esittää p-nitrobentsyylibromidin käyttöä reaktiossa "suojatun" dietyleenitriamiinin, ts. bis-(2-pftalimidoetyyli)amiinin, kanssa, jota seuraavat suojauksenpoistomenettelyt ja karboksimeetylaatio, jossa käytetään kloorietikkahappoa, jolloin muodostuu N'-p-nitrobentsyyli-

20 dietyleenitriamiini-N,N,N'',N''-tetraetikkahappo. Koska liittyminen tapahtuu typen kautta, saadaan tässäkin tapauksessa tetraetikkahappojohdannainen. Julkaisussa käsitellään bifunktionaalisen kelaatinmuodostajan kytkemistä ja kelaatin muodostamista indiumin kanssa. Myös Eckelman

25 et al., [J. Pharm. Sci. 64 (1975, nro 4)] kuvaavat typiatomin kohdalla tehtävää substituointia amiinien reaktiolla, kuten "etyleenidiamiinin tai dietyleenitriamiinin reaktiolla sopivan alkyylibromidin kanssa ennen karboksimeetylaatiota". Yhdisteitä ehdotetaan mahdollisiksi radiofarmaseuttisiksi kuvausaineiksi.

30

Vähän aikaan sitten Carney, Rogers ja Johnson (3rd. International Conference on Monoclonal Antibodies; San Diego, California - 4 - 6. helmikuuta 1988) ovat julkistaneet tiivistelmät, joiden otsikkoina ovat "Absence of

35 Intrinsically Higher Tissue Uptake from Indium-111 Labeled

Antibodies: Co-administration of Indium-111 and Iodine-125 Labeled B72.3 on a Nude Mouse Model" ja "Influence of Chelatro Denticity on the Biodistribution of Indium-111 Labeled B72.3 Immunoconjugates in Nude Mice". Julkaisuissa

5 käsitellään bifunktionaalisten kelaatinmuodostajien EDTA:n ja DTPA:n kanssa kompleksoidun indium-111:n biologista jakautumista. Aromaattisen renkaan liittyminen EDTA- tai DTPA-ryhmittymiin tapahtuu asetaattiryhmän kautta. Hunt et al. (US-patenttijulkaisut 4 088 747 ja 4 091 088, 1978)

10 ovat esittäneet etyleenidiamiinidietikkahappoon (EDDA) perustuvia kelaatinmuodostajia, joissa aromaattisen renkaan liittyminen EDDA-ryhmittymään tapahtuu alkyleeni- tai asetaattiryhmän kautta. Näiden yhdisteiden ilmoitetaan olevan käyttökelpoisia maksan ja sapen toiminnan tut-

15 kimiseen tarkoitettuina kelaatteina. Edullinen metalli on teknetium-99m. Indium-111:n ja indium-113:n ilmoitetaan olevan myös käyttökelpoisia kuvaukseen käytettävinä radio-nuklideina.

20 Martell et al. [Inorganica Chemica Acta 138 (1987) 215 - 230] esittävät rautaa kelatoivaa ainetta käytettäväksi Cooleyn anemian hoitoon. Käytetyt ligandit olivat EDTA-analogeja, joissa on amino- ja karboksylaattidonori-ryhmiä tai ylimääräisiä donori-ryhmiä, kuten fenoliryhmiä tai pyridiinirenkaiden substituentteina olevia fenoliryhmiä; aminofosfonihappo- tai esteriryhmiä, joissa

25 on ylimääräisiä fenolaatti- ja aminodonoryhmiä; makrosyklisiä polyamiineja, joissa on karboksylaatti- ja/tai fenolaattidonoryhmiä; trishydroksaamihappoja; triskatekoleja; ja monihampaisia ligandeja, joissa on koordinoivia amidi-

30 ryhmiä.

Luuetäpesäkkeiden kehittyminen on yleinen ja syöpäpotilaalle usein katastrofaalinen tapahtuma. Kipu, patologiset murtumat, usein esiintyvät neurologiset häiriöt ja pakollinen paikallaanolo, joita nämä etäpesäkkeet aiheuttavat, heikentävät merkittävästi syöpäpotilaan elämänlaat-

35

ua. Etäpesäkkeitä saavien potilaiden lukumäärä on suuri, sillä lähes 50 %:lla kaikista rinta-, keuhko- tai eturauhassyöpäpotilaista, kehittyy lopulta luuetäpesäkkeitä. Luuetäpesäkkeitä havaitaan myös munuais-, kilpirauhas-, virtsarakko-, kohdunkaula- ja muilla syöpäpotilailla, ja yhdessä nämä ryhmät edustavat alle 20 %:a potilaista, joille kehittyy luuetäpesäkkeitä. Etäpesäkeluussyöpä on harvoin hengenvaarallinen, ja joskus potilaat elävät vuosia luuvaurioiden havaitsemisen jälkeen. Hoidon päämääränä on aluksi kivun lievittäminen, narkoottisten lääkkeiden tarpeen vähentäminen ja liikkuvuuden lisääminen. On selvää, että toivotaan voitavan parantaa joitakin syöpiä.

Radionuklidien käyttö luuetäpesäkkeitä muodostavan syövän hoitoon juontaa juurensa 1950-luvun alkupuolelle. On ehdotettu sopivassa muodossa olevan radioaktiivisia hiukkasia emittoivan nuklidin injektoimista luuvaurioiden hoitamiseksi. On toivottavaa, että tällaiset nuklidit keskittyisivät luuvaurioalueelle ja hyvin pieniä määriä joutuisi pehmytkudokseen ja normaaliin luuhun. On ehdotettu radioaktiivisia fosfori (^{32}P - ja ^{33}P -)yhdisteitä, mutta tumma- ja biologiset kohdentumisominaisuudet rajoittavat näiden yhdisteiden käyttökelpoisuutta [Kaplan, E. et al., J. Nuc. Med. 1 (1960, nro 1) 1; US-patenttijulkaisu 3 965 254].

On myös yritetty hoitaa luussyöpää käyttämällä fosforiyhdisteitä, jotka sisältävät booriryhmän. Yhdisteitä on injektoitu elimistöön (laskimonsisäisesti) ja ne ovat kerääntyneet luustoon. Hoidettavaa aluetta on sitten säteilytetty neutroneilla boorin aktivoimiseksi ja terapeutisen säteilyannoksen aikaansaamiseksi (US-patenttijulkaisu 4 399 817).

Edellä mainittujen menettelyjen yhteydessä ei ole mahdollista antaa kasvaimeen terapeuttisia annoksia vaurioittamatta olennaisesti normaaleja kudoksia. Monissa tapauksissa, erityisesti luuetäpesäkkeiden yhteydessä,

kasvain on levinnyt kaikkialle luustoon, eikä amputointi tai sädehoito ole järkevää [Seminars in Nuclear Medicine IX(2), huhtikuu 1979].

5 On myös ehdotettu difosfonaatin kanssa kompleksoidun ^{186}Re :n käyttöä [Mathieu, L. et al., Int. J. App. Rad. & Isot. 30 (1979) 725 - 727; Weinenger, J., Ketiring, A. R. et al., J. Nuc. Med. 24 (1983, nro 5) 125]. Tämän kompleksin yhteydessä valmistus ja tarvittava puhdistus rajoittavat kuitenkin sen käyttökelpoisuutta ja laajaa
10 käyttöä.

On myös ehdotettu strontium-89:ä potilaille, joilla on luuetäpesäkkeitä. Haittana voi kuitenkin olla pitkä puoliintumisaika (50,4 vrk), korkeat pitoisuudet veressä ja alhaiset vaurion ja normaalin luun väliset suhteet
15 [Firusian, N., Mellin, P., Schmidt, C. G., The Journal of Urology 116 (1976) 764; Schmidt, C. G., Furusian, N., Int. J. Clin. Pharmacol. 93 (1974) 199 - 205].

On kuvattu luuetäpesäkkeiden lievittävää hoitoa, jossa käytetään ^{131}I -leimattua α -amino-(3-jodi-4-hydroksibentsylideeni)difosfonaattia [Eisenhut, M., J. Nuc. Med. 25 (1984, nro 12) 1356 - 1361]. Radiojodin käyttö terapeuttisena radionuklidina on vähemmän toivottavaa, koska jodilla on tunnetusti taipumus kohdentua kilpirauhaseen. Eisenhut mainitsee jodin yhtenä tämän yhdisteen mahdollisena metabolituotteena. Lisäksi mahdollinen jodausreaktiosta ylijäänyt ^{131}I , jota ei ole erotettu pesumenetel-
20 lyssä, muodostaa myös vaaran kilpirauhaselle.

Aminokarboksyylihappojen tiedetään kelatoituvan metalli-ionien kanssa. Erityisen stabiileja kelaatteja muodostuu maa-alkalimetallien ja siirtymämetallien kanssa.
30

O'Mara et al. [J. Nuc. Med. 10 (1969) 49 - 51] ovat valmistaneet aminokarboksyylihappojen komplekseja harvinaisten maametallien kanssa, joissa kelaatinmuodostajan ja metallin suhde on 10:1. Heidän havaintojensa mukaan
35 luusto-ominaisuudet ovat hyvät, ja he ehdottavat mainit-

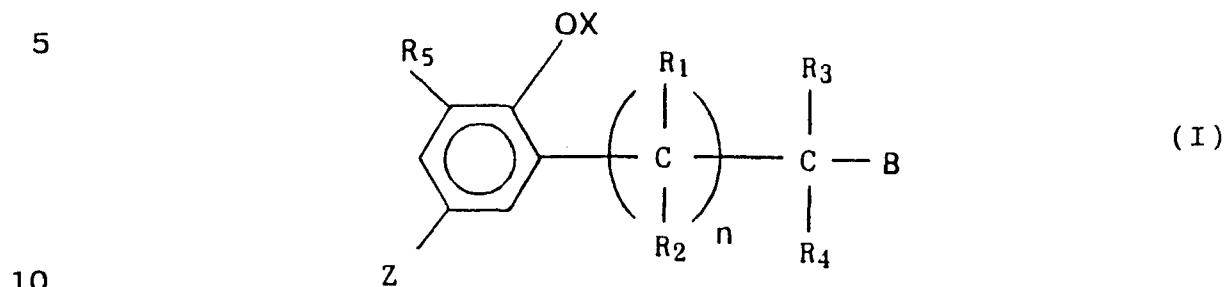
tujen yhdisteiden käyttöä luuston diagnosointiaineina. Korkean luuhun oton lisäksi on havaittu suuria säteilymääriä lihaksessa ja/tai maksassa. Tutkituista harvinaisten maametallien nuklideista osoitettiin ^{153}Sm :n ja ^{171}Er :n olevan ominaisuuksiltaan sopivimpia ihmisten kuvaamiseen. Näiden aineiden käyttöä terapiaan ei kuitenkaan ehdoteta.

Rosoff, B. et al. [Int. J. App, Rad. and Isot. 14 (1963) nuklidien, nimittäin ^{46}Sc :n, ^{91}Y :n, ^{140}La :n ja ^{153}Sm :n kanssa. Julkaisussa osoitetaan näiden kompleksien stabiiliteettivakion ja virtsanerityksen välinen riippuvuus. On käytetty kelaatinmuodostajan ja metallin välistä moolisuhdetta 5:1 ja havaittu suuria radioaktiivisuuspitoisuuksia maksassa, pernassa, munuaisissa, keuhkoissa ja luussa.

Tämä keksintö koskee uusia ortoligeeraavia kelaatinmuodostajia, jotka muodostavat komplekseja metallien, erityisesti "radioaktiivisten" metallien, kanssa, jotka ovat kemialliselta käyttäytymiseltään harvinaisten maametallien kaltaisia. Edullisiin radioaktiivisiin metalleihin kuuluvat samarium-153 (^{153}Sm), holmium-166 (^{166}Ho), yttrium-90 (^{90}Y), prometium-149 (^{149}Pm), gadolinium-159 (^{159}Gd), lantaani-140 (^{140}La), lutetium-177 (^{177}Lu), ytterbium-175 (^{175}Yb), skandium-47 (^{47}Sc) ja praseodyymi-142 (^{142}Pr). Sitten muodostettuja komplekseja voidaan käyttää sellaisenaan tai niitä voidaan liittää vasta-aineeseen tai sen osaan ja käyttää terapeuttisiin ja/tai diagnostisiin tarkoituksiin. Komplekseja ja/tai konjugaatteja voidaan formuloida käytettäväksi in vivo tai in vitro. Formuloitujen konjugaattien edullisiin käyttötarkoituksiin kuuluu eläinten, erityisesti ihmisten, syövän hoito.

Lisäksi voidaan tiettyjä kelaatinmuodostaja-radio-nuklidikomplekseja käyttää tehokkaasti koostumuksissa, jotka ovat käyttökelpoisia luukasvainten hoidossa ja/tai diagnosoinnissa, tai koostumuksissa, jotka ovat käyttökelpoisia luukivun helpottamiseen tarkoitettuina terapeuttisina aineina.

Tarkemmin määriteltynä tämä keksintö koskee yhdisteitä, joilla on kaava I,



jossa

Z on elektrofiilinen tai nukleofiilinen ryhmittymä, joka voidaan liittää vasta-aineeseen tai sen osaan tai synteettiseen kytkijään, joka ei häiritse kompleksin muodostamista radionuklidin kanssa ja joka voidaan liittää vasta-aineeseen tai sen osaan;

X on vetyatomi, C₁₋₃-alkyliryhmä tai ryhmä CR₃R₄COOH; kukin ryhmistä R₁, R₂, R₃ ja R₄ on riippumattomasti vetyatomi, hydroksyyli- tai karboksyyli-ryhmä, ryhmä CO₂H tai C₁₋₃-alkyliryhmä;

R₅ on vetyatomi tai ryhmä (CR₁R₂)_nCR₃R₄B;

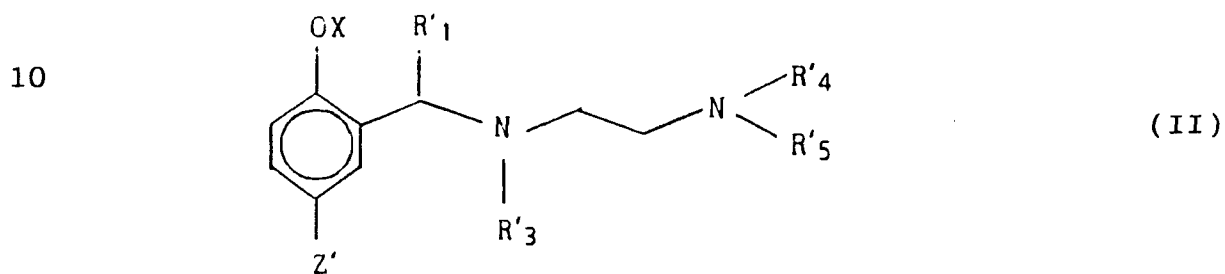
B on suoraketjuinen tai haaroitettu amiini- tai polyalkyleeniamiiniryhmä, jossa vähintään yksi amiinivaihtelusta on korvautunut ryhmällä CR₃R₄COOH; n on 0 tai 1; tai

tällaisen yhdisteen farmaseuttisesti hyväksyttäviä suoloja.

Karboksyyli-ryhmä (kun sellainen on läsnä) liitetään edullisesti B-ryhmän typpi-atomiin lukien ensimmäiseen tai toiseen hiileen, ts. hiileen, joka on α- tai β-asemassa kelaatinmuodostajaryhmän typpi-atomiin nähden. Edullisia kaavan I mukaisia yhdisteitä ovat ne, joissa n on 0; tai kukin ryhmistä R₁, R₂, R₃ ja R₄ on vetyatomi; tai n on 0 ja toinen ryhmistä R₃ ja R₄ on vetyatomi ja toinen on COOH;

5 tai X on vetyatomi. Kun kelaatinmuodostajia on määrä käytt-
tää bifunktionaalisina kelaatinmuodostajina, Z on edul-
lisesti amiini-, isotiosyanaatti, semikarbatsidi, tiosemi-
karbatsidi-, karboksyyli, bromiasetamidi- tai maleimidi-
ryhmä.

Lisäksi tämä keksintö koskee yhdisteitä, joilla on
kaava II,



15

jossa

Z' on vetyatomi tai ryhmä NH_2 , NO_2 , NHC(O)CH_3 tai N(R')_2 , jossa R' on vetyatomi tai C_{1-3} -alkyyli-ryhmä;

20 X on vetyatomi, C_{1-3} -alkyyli-ryhmä tai ryhmä $\text{CR}_3\text{R}_4\text{COOH}$;

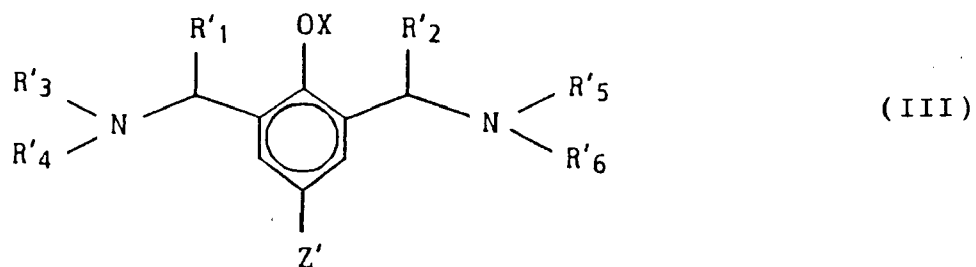
R'1 on vetyatomi tai ryhmä COOH ;

kukin ryhmistä R'3, R'4 ja R'5 on riippumattomasti
vetyatomi tai ryhmä $\text{CR}_3\text{R}_4\text{COOH}$ sillä edellytyksellä, että
vähintään yksi ryhmistä R'1, R'3, R'4 ja R'5 on vetyatomi;

25 tai tällaisen yhdisteen farmaseuttisesti hyväksyt-
täviä suoloja.

Lisäksi tämä keksintö koskee yhdisteitä, joilla on
kaava III,

30



35

jossa

Z' on vetyatomi tai ryhmä NH_2 , NO_2 , NHC(O)CH_3 tai N(R')_2 , jossa R' on vetyatomi tai C_{1-3} -alkyyli-ryhmä;

5 X on vetyatomi, C_{1-3} -alkyyli-ryhmä tai ryhmä $\text{CR}_3\text{R}_4\text{COOH}$;

kumpikin ryhmistä R'₁ ja R'₂ on vetyatomi tai ryhmä COOH sillä edellytyksellä, että vähintään toinen on COOH ;

10 kukin ryhmistä R'₃, R'₄, R₅ ja R'₆ on riippumattomasti vetyatomi tai ryhmä $\text{CR}_3\text{R}_4\text{COOH}$ sillä edellytyksellä, että vähintään kolme niistä on ryhmiä $\text{CR}_3\text{R}_4\text{COOH}$,

tai tällaisen yhdisteen farmaseuttisesti hyväksyttäviä suoloja.

Tämä koskee myös radioaktiivisten metalli-ionien komplekseja, erityisesti radioaktiivisten harvinaisten
15 maametallien tyyppisten metalli-ionien komplekseja, ja edellä mainittujen kompleksien ja vasta-aineiden tai vasta-ainefragmenttien muodostamia konjugaatteja. Lisäksi tämän keksinnön piiriin kuuluvat myös formulat, jotka sisältävät keksinnön mukaisia kelaatinmuodostaja-radionuklidikomplekseja ja/tai konjugaatteja ja farmaseuttisesti
20 hyväksyttävää kantaja-ainetta. Farmaseuttisesti hyväksyttävä kantaja-aine on näissä formuloissa tyypillisesti nestemuodossa. Keksinnön piiriin kuuluu myös menetelmä nisäkkään sairaustilan, erityisesti syövän, diagnosoimiseksi tai hoitamiseksi antamalla nisäkkäälle vaikuttava määrä mainittua formulaa.

Tässä käytetyillä termeillä on seuraavat merkitykset: ryhmä Z määritelmässä "elektrofiilisiin" ryhmittymiin kuuluvat, mainittuihin kuitenkin rajoittumatta, isotio-
30 syanaatti-, bromiasetamidi-, maleimidi-, imidoesteri-, tioftalimidi-, N-hydroksisukkinimidyyliesteri-, pyridyyliidi-, sulfidi- ja fenyyliatsidiryhmät; soveltuviin "nukleofiilisiin" ryhmittymiin kuuluvat, mainittuihin kuitenkin rajoittumatta, karboksyyli-, amiini-, asyylihydrat-
35 sidi- ja semikarbatsidi- ja tiosemikarbatsidiryhmät; "syn-

teettisiin kytkijöihin" kuuluvat mitkä tahansa synteettiset orgaaniset tai epäorgaaniset kytkijät, jotka voidaan liittää kovalenttisesti vasta-aineeseen tai vasta-ainefragmenttiin, jolloin edullisia synteettisiä kytkijöitä

5 ovat biologisesti hajoavat synteettiset kytkijät, jotka ovat stabiileja potilaan seerumissa, mutta ovat entsymaattisesti lohkaistavissa radioisotoopin poistumisesta vastaavassa elimessä, esimerkiksi biologisesti hajoavat peptidit tai peptidipitoiset ryhmät. Elektrofiilisistä ryhmittymistä ovat edullisia isotiosyanaatti-, bromiasetamidi- ja maleimidiryhmät, erityisesti isotiosyanaattiryhmä; ja nukleofiilisistä ryhmittymistä ovat edullisia amiini-,

10 karboksyyli-, semikarbatsidi- ja tiokarbatsidiryhmät, erityisesti amiini- ja karboksyyli-ryhmät. On toivottavaa, että ryhmä Z luonne ja/tai asema on sellainen ettei se merkittävästi häiritse kelaatinmuodostusreaktiota. Z voi olla myös reagoimaton ryhmittymä, kuten H, NO₂, NHC(O)CH₃ tai NR'₂ (jossa R' on pn H tai C₁₋₃-alkyyli), kun kelaattia ei liitetä proteiiniin lopullisen käytön yhteydessä.

15

20 Termin "C₁₋₃-alkyyli" piiriin kuuluvat metyyli-, etyyli-, n-propyyli- ja isopropyyli-ryhmät.

Termi "lineaarinen tai haaroittunut amiini tai polyalkyleeniamiini" tarkoittaa suoraketjuisia tai haaroittuneita alkyyli-ryhmiä, jotka sisältävät vähintään yhden ja tavallisesti useamman kuin yhden typpi-atomia.

25

Tässä käytettynä termi "nisäkäs" tarkoittaa eläimiä, jotka ruokkivat poikasiaan rintarauhasen erittämällä maidolla, edullisesti vaihtolämpöisiä eläimiä, edullisemmin ihmisiä.

30 "Vasta-aine" tarkoittaa mitä tahansa polyklonaalista, monoklonaalista tai kimeeristä vasta-ainetta tai heterovasta-ainetta, edullisesti monoklonaalista vasta-ainetta; termin "vasta-ainefragmentti" piiriin kuuluvat Fab- ja F(ab')₂-fragmentit ja mikä tahansa vasta-aineen osa, joka

35 on spesifinen haluttujen yhden tai useamman epitoopin suh-

teen. Kun käytetään termiä "radioaktiivinen metallikelaatti-vasta-ainekonjugaatti" tai "konjugaatti", termin "vasta-aine" piiriin on tarkoitettu kuuluviksi kokonaiset vasta-aineet ja/tai vasta-ainefragmentit, mukaan luettuina
 5 niiden semisynteettiset ja geeniteknisesti muodostetut variantit. Edullisia vasta-aineita ovat CC-49 ja vasta-ainefragmentit, kuten Fab ja $F(ab')_2$. Muita mahdollisia vasta-aineita ovat CC-83 ja B72.3. Hybridomasolulinja B72.3 on talletettu American Type Culture Collectioniin
 10 (ATCC), ja sen hakunumero on ATCC HB 8108. Jotkut hiiren monoklonaaliset vasta-aineet sitoutuvat TAG-72:n, kasvaimen liittyvän antigeenin, epitoppeihin.

Tässä käytettynä termi "radioaktiivinen metallikompleksi" tai "kompleksi" tarkoittaa keksinnön, esimerkiksi kaavan I, mukaisen yhdisteen kompleksia harvinaisten
 15 maametallien tyyppiä olevan metalli-ionin, erityisesti radioaktiivisten harvinaisten maametallien tyyppiä olevan metalli-ionin, kanssa, jossa on vähintään yksi metalliatomi kelatoituna tai kompleksoituna; "radioaktiivisen
 20 metalli-ionikelaatti-vasta-ainekonjugaatti" tai "radioaktiivinen metalli-ionikonjugaatti" tarkoittaa vasta-aineeseen tai vasta-ainefragmenttiin kovalenttisesti liitettyä radioaktiivista metalli-ionikonjugaattia; "radioaktiivinen" tarkoittaa sanan "metalli-ioni" yhteydessä
 25 käytettynä harvinaisten maametallien tyyppisten alkuaineiden yhtä tai useampaa hiukkasia ja/tai fotoneja emittoivaa isotooppia, kuten ^{153}Sm , ^{166}Ho , ^{90}Y , ^{149}P , ^{159}Gb , ^{140}La , ^{177}Lu , ^{175}Yb , ^{47}Sc ja ^{142}Pr . Termejä "bifunktionaalinen koordinoija", "bifunktionaalinen kelaatinmuodostaja" ja "funktionalisoitu kelaatinmuodostaja" käytetään toistensa vastineina, ja
 30 ne tarkoittavat yhdisteitä, joissa on kelaatinmuodostajaryhmä, jolla on kyky kelatoida metalli-ioni, ja kelaatinmuodostajaryhmään kovalenttisesti sidottu kytkijä- eli väliryhmä, jolla kyky sitoutua kovalenttisesti vasta-aineeseen tai vasta-ainefragmenttiin.
 35

Tässä käytettynä "farmaseuttisesti hyväksyttävä suola" tarkoittaa mitä tahansa kaavan I mukaisen yhdisteen suolaa, joka on riittävän myrkytön ollakseen käyttökelpoinen nisäkkäiden hoidossa tai diagnosoinnissa. Niinpä suolat ovat käyttökelpoisia tämän keksinnön mukaisesti. Tyyppillisiä esimerkkejä suoloista, joita muodostetaan tavanomaisiin reaktioihin sekä orgaanisista että epäorgaanisista lähtöaineista, ovat esimerkiksi rikki-, vetykloridi-, fosfori-, etikka-, meripihka-, sitruuna-, maito-, maleiini-, fumaari-, palmitiini-, sappi-, pamoini-, musiini-, glutamiini-, d-kamfori-, glutaari-, glykoli-, ftaali-, viini-, muurahais-, lauriini-, steariini-, salisyyli-, metaanisulfoni-, bentseenisulfoni-, sorbiini-, pikriini-, bentsoe- ja kanelihapposuolat ja muiden soveltuvien happojen suola. Mukaan luetaan myös suolat, joita muodostetaan tavanomaisiin reaktioihin sekä orgaanisista että epäorgaanisista lähtöaineista, kuten ammonium-, alkalimetalli- ja maaalkalimetalli-ioneista ja muista senkaltaisista ioneista. Erityisen edullisia ovat kaavan I mukaisten yhdisteiden kalium-, natrium- ja ammoniumsuolat tai niiden seokset.

Tässä kuvattuja bifunktionaalisia kelaatinmuodostajia (joita edustaa kaava I) voidaan käyttää kelatoimaan tai kompleksoimaan harvinaisten maametallien tyyppiä olevia metalli-ioneja, erityisesti radioaktiivisia harvinaisten maametallien tyyppisiä metalli-ioneja, jolloin muodostuu metalli-ionikelaatteja (joita kutsutaan tässä myös "komplekseiksi"). Komplekseja voidaan funktionalisoivan ryhmittymän ("Z" kaavassa I) läsnäolon ansiosta liittää funktionalisoituihin kantajiin, kuten funktionalisoituihin polymeerikantajiin, tai edullisesti kovalenttisesti vasta-aineisiin tai vasta-ainefragmentteihin. Niinpä tässä kuvattuja komplekseja voidaan liittää kovalenttisesti vasta-aineeseen tai vasta-ainefragmenttiin, jolloin niitä kutsutaan tässä "konjugaateiksi".

Vasta-aineita tai vasta-ainefragmentteja, joita voidaan käyttää tässä kuvatuissa konjugaateissa, voidaan valmistaa alalla hyvin tunnetuin menetelmin. Hyvin spesifisiä monoklonaalisia vasta-aineita voidaan valmistaa alalla hyvin tunnetuin hybridisaatiomenetelmin [katso esimerkiksi Kohler ja Milstein, Nature 256 (1975) 495 - 497; Eur. J. Immunol. 6 (1976) 511 - 519]. Tällaiset vasta-aineet reagoivat normaalisti hyvin spesifisesti. Kohdennetuissa vasta-aineen ja radioaktiivisen metalli-ionin konjugaateissa voidaan käyttää minkä tahansa halutun antigeenin tai hapteenin vastaisia vasta-aineita. Radioaktiivisissa metalli-ionikonjugaateissa käytettävät vastaaineet ovat edullisesti monoklonaalisia vasta-aineita tai niiden fragmentteja, jotka ovat hyvin spesifisiä haluttujen yhden tai useamman epistoopin suhteen. Tämän keksinnön yhteydessä käytettävät vastaaineet voivat suuntautua esimerkiksi kasvaimia, bakteereja, sienä, viruksia, parasitteja, mykoplasmoja, erilaistumis- ja muita solukalvoantigeeneja, patogeenien pinta-antigeeneja, toksineja, entsyymejä, allergeeneja, lääkkeitä ja mitä tahansa biologisesti aktiivisia molekyylejä vastaan. Joitakin esimerkkejä vasta-aineista tai vasta-ainefragmenteista ovat CC-11, CC-15, CC-30, CC-46, CC-49 F(ab')₂, CC-49, CC-83, CC83 F(ab')₂, CC-92 ja B72.3. [Vasta-aineita CC-49, CC-83 ja B72.3 kuvataan julkaisussa D. Colcher et al., Cancer Res. 48 (15. elokuuta 1988) 4597 - 4603.]. Seuraavat CC-vastaaineet on talletettu ATCC:hen seuraavilla numeroilla: CC-11, HB 9455; CC-15, HB 9460; CC-30, HB 9457; CC-46, HB 9458; CC-49, HB 9459; CC-83, HB 9453; ja CC-92, HB 9454. B72.3 on talletettu ATCC:hen numerolla HB 8108. Täydellisempi luettelo antigeeneista esitetään US-patenttijulkaisussa 4 193 983. Tämän keksinnön mukaiset radioaktiivisen metalli-ionikelaatin ja vasta-aineen konjugaatit ovat erityisen edullisia erilaisten syöpien diagnosoinnin ja hoidon kannalta.

Tämän keksinnön mukaisia edullisia harvinaisten maametallien tyyppisten metalli-ionien (lantanidien tai pseudolantanidien) komplekseja edustaa kaava .



joissa Ln on harvinaisen maametallin (lantanidi-) ioni, kuten Ce^{3+} , Pr^{3+} , Nd^{3+} , Sm^{3+} , Eu^{3+} , Gd^{3+} , Tb^{3+} , Dy^{3+} , Ho^{3+} , Er^{3+} , Tm^{3+} , Y^{3+} tai Lu^{3+} , tai pseudolantanidi-ioni, kuten Sc^{3+} , Y^{3+} , tai La^{3+} ; BFC on bifuntionaalinen kelaatinmuodostaja; ja C on farmaseuttisesti hyväksyttävä ioni tai ioniryhmä, jolla on riittävä varaus koko kompleksin tekemiseksi neutraaliksi. Jos BFC sisältää neljä tai useampia negatiivisesti varautuneita ryhmittymiä, on C kationi tai kationiryhmä, Kuten H^+ , Li^+ , Na^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Ra^{2+} , NH_4^+ , $N(CH_3)_4^+$, $N(C_2H_5)_4^+$, $N(C_3H_7)_4^+$, $N(C_4H_9)_4^+$, $As(C_6H_5)_4^+$, $[(C_6H_5)_3P=]_2N^+$ tai muu protonoitu amiini. Jos PBC sisältää kolme negatiivisesti varautunutta ryhmää, ei C:tä tarvita. Jos BFC sisältää kaksi negatiivisesti varautunutta ryhmittymää, C on anioni, kuten F^- , Cl^- , Br^- , I^- , ClO_4^- , BF_4^- , $H_2PO_4^-$, HCO_3^- , HCO_2^- , $CH_3SO_3^-$, $H_3C-C_6H_4-SO_3^-$, PF_6^- , $CH_3CO_2^-$ tai $B(C_6H_5)_4^-$.

Tämän keksinnön mukaista tuotetta käytetään yhdessä fysiologisesti hyväksyttävän kantaja-aineen, jatkeaineen tai vehikkelin kanssa. Menetelmät tällaisten formuloiden valmistamiseksi ovat hyvin tunnettuja. Formulot voivat olla suspension tai injektoitavissa olevan liuoksen muodossa tai muuna sopivana formulana. Voidaan käyttää fysiologisesti hyväksyttäviä suspendointiväliaineita yhdessä apuaineiden kanssa tai ilman niitä.

Hoitoon käytetään "vaikuttava määrä" formulaa. Annos vaihtelee hoidettavan sairauden mukaan. Vaikka tämän keksinnön mukaisten formuloiden avulla voidaan toteuttaa in vitro -diagnostiikkaa, on myös in vivo -diagnostiikka, jossa käytetään tämän keksinnön mukaisia formuloita, kek-

sinnön ajatuksen mukainen. Tämän keksinnön mukaisia kon-
 jugaatteja ja formuloita voidaan käyttää myös radioim-
 muuniohjatussa kirurgiassa (RIGS); muihin metalleihin,
 joita voitaisiin käyttää tähän tarkoitukseen, kuuluvat
 5 kuitenkin myös ^{99m}Tc , ^{111}In , ^{113m}In , ^{67}Ga ja ^{68}Ga .

Kun tämän keksinnön mukaisia kelaatinmuodostaja-
 radionuklidikomplekseja on määrä käyttää luusyövän hoi-
 toon, täytyy täyttää tiettyjä vaatimuksia. Vaikka radio-
 nuklidin ominaisuudet ovat tärkeitä, ovat määräävänä teki-
 10 jänä radionuklidi-kelaatinmuodostajakompleksia sisältävän
 koostumuksen kokonaisominaisuudet.

Minkä tahansa ominaisuuden haittapuolet voidaan
 voittaa joko ligandin tai radionuklidin yhden tai useamman
 ominaisuuden paremmuudella, ja näiden koostumuksessa käy-
 15 tettävien tekijöiden yhdistelmää tulee tarkastella koko-
 naisuutena.

Seuraavassa käsitellään kriteerejä, jotka tulee
 olla huomioon valittaessa keksinnön mukaisissa koostumuk-
 sissa kulloinkin käytettävää radionuklidin ja ligandin
 20 yhdistelmää (ts. kompleksia). Ellei läsnä ole asianmukais-
 ta ylimäärää keksinnön yhteydessä käytettäviä ligandeja,
 radionuklidi-kelaatinmuodostajakompleksit eivät ehkä ole
 terapeuttisesti käyttökelpoisia tai tehokkaita.

Siksi tarvitaan koostumuksia, jotka täyttävät seu-
 25 raavat kriteerit, joiden avulla on mahdollista viedä tera-
 peuttisia säteilyannoksia luukasvaimiin pehmytkudokseen
 menevien annosten ollessa hyvin pieniä.

Radionuklidi tulee viedä ensisijaisesti luuhun peh-
 mytkudoksen sijasta. Erityisesti joko maksaan tai vereen
 30 joutuminen on epätoivottavaa.

Radionuklidin tulisi poistua nopeasti muusta kuin
 luukudoksesta tällaisten kudosten tarpeettomien vaurioiden
 välttämiseksi; sen tulisi poistua nopeasti esimerkiksi
 verestä.

Joidenkin tämän keksinnön mukaisten koostumusten ehdotettu käyttö on eläinten luukasvainten hoito. Tässä käytettynä termin "luukasvaimet" piiriin kuuluvat primaariset kasvaimet, joissa luusto on ensimmäinen sairaus-

5 tumiskohta, ja etäpesäkeluusyöpä, jossa kasvain leviää muista primaarisista kohdista, kuten eturauhasesta ja rinnasta, luustoon. Tämä keksintö tarjoaa käyttöön keinon kivun lievittämiseksi ja/tai luukasvainten koon pienentämiseksi ja/tai kasvun estämiseksi ja/tai leviämisen es-

10 tämiseksi tai takautumisen aikaansaamiseksi ja/tai tuhoamiseksi antamalla terapeutti- säteilyannos.

Koostumus voidaan antaa yhtenä annoksena tai useina annoksia pidemmän ajan kuluessa. Radionuklidia tulee viedä kasvaimen riittävä määrä edellä mainittujen etujen ai-

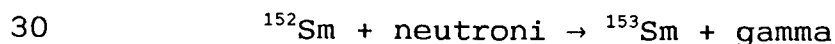
15 kaansaamiseksi.

Joidenkin keksinnön mukaisten kelaatinmuodostajien muihin käyttötarkoituksiin saattavat kuulua epätoivottavien metallien (esimerkiksi raudan) poistaminen elimistöstä, NMR-kuvaus, kiinnittäminen polymeerikantajiin erilaisia tarkoituksia varten, esimerkiksi diagnostisiksi väli-

20 neiksi ja lantanidi- tai pseudolantanidi-ionin poistaminen selektiivisellä uutolla. Lisäksi metalli-ligandikomplekseilla, joita käytetään viemään radionuklideja luustokohtiin, voi olla käyttöä luuytimen tyhjennyksessä (ts. luuydinsiirtojen yhteydessä).

25

Radionuklideja voidaan valmistaa muutamalla tavalla. Ydinreaktorissa nuklidia pommitetaan neutroneilla, jolloin muodostuu radionuklidi, esimerkiksi



Eräs menetelmä radionuklidien valmistamiseksi on nuklidien pommittaminen lineaarikiihdyttimellä tai syklotronilla tuotetuilla hiukkasilla. Eräs tapa on radionuklidin eristäminen fissiotuoteseoksesta. Menetelmä tämän

35

keksinnön yhteydessä käytettävien nuklidien valmistamiseksi ei ole ratkaiseva keksinnön kannalta.

Tässä esitettäviä kelaatinmuodostajia voidaan valmistaa alalla hyvin tunnetuin tavoin. Katso esimerkiksi
 5 Chelating Agents and Metal Chelates, Dwyer & Mellor, Academic Press 1964, luku 7. Katso myös esitystä menetelmistä aminohappojen valmistamiseksi teoksessa Synthetic Production and Utilization of Amino Acids, toim. Kameko et al., John Wiley & Sons 1974.

10 Kun ryhmäksi Z (kaavassa) valitaan elektrofiilinen ryhmittymä, se voidaan valmistaa alalla tunnetuin menetelmin. Tällaisia menetelmiä kuvataan julkaisussa Acc. Chem. res. 17 (1984) 202 - 209.

Esimerkkejä joistakin menetelmistä, joita voidaan
 15 käyttää kaavojen I, II tai III mukaisten kelaatinmuodostajien valmistamiseen, ovat seuraavat:

A) saatetaan yhdiste, jolla on kaava,



jossa Z on elektrofiilinen tai nukleofiilinen ryhmittymä, joka voidaan liittää kovalenttisesti vasta-aineeseen tai vasta-ainefragmenttiin tai synteettiseen kytkijään, joka ei häiritse radionuklidikompleksin muodostusta ja joka
 30 voidaan liittää vasta-aineeseen tai vasta-ainefragmenttiin;

X on vetyatomi;

R₅ on vetyatomi tai ryhmä (CR₁R₂)_nCR₃R₄T, jossa kukin ryhmistä R₁, R₂, R₃, ja R₄ on riippumattomasti vetyatomi,
 35 hydroksyyli-ryhmä, ryhmä CO₂H tai C₁₋₃-alkyyli-ryhmä, n on 0

tai 1 tai T on suoraketjuinen tai haaroittunut amiini tai polyalkyleeniamiini, jossa vähintään yksi amiinivedyistä on korvattu ryhmällä $\text{CR}_3\text{R}_4\text{CO}_2\text{H}$;

5 tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävä suola reagoimaan yhdisteen B ja aldehydin tai vastaavan aldehydiesiasteen kanssa, jolloin B on suoraketjuinen tai haaroittunut amiini tai polyalkyleeniamiini, jossa on vähintään yksi amiinivety, emäksen ja sopivan liuottimen läsnä ollessa korkeintaan lämpötilassa $20\text{ }^\circ\text{C}$, minkä jälkeen seosta
10 kuumennetaan ja erotetaan haluttu tuote, jolla on kaava I, II tai III;

B) saatetaan vaiheessa A valmistettu tuote reagoimaan halogeeni $(\text{CR}_1\text{R}_2)_n\text{CR}_3\text{R}_4$ -hapon kanssa pH-arvon ollessa vähintään 9 emäksen läsnäollessa korkeintaan lämpötilassa
15 $20\text{ }^\circ\text{C}$, jolloin saadaan kaavan I, II tai III mukaisia yhdisteitä, joissa vähintään yksi ryhmistä R_1 , R_2 , R_3 ja R_4 on CO_2H ;

C) hydrolysoidaan vaiheessa B saatu tuote, jossa Z on NHC(O)CH_3 , NaOH:n vesiliuoksella, jolloin saadaan kaavan
20 I, II tai III mukaisia tuotteita, joissa Z on NH_2 ;

D) saatetaan vaiheessa A saatu tuote reagoimaan glykolinitriilin kanssa emäksen läsnä ollessa pH:n ollessa vähintään 9 korkeintaan lämpötilassa $20\text{ }^\circ\text{C}$ ja hydrolysoidaan sitten syaaniryhmä HCl:n vesiliuoksella, jolloin saadaan kaavan I, II tai III mukaisia tuotteita, joissa vähintään yksi ryhmistä R_1 , R_2 , R_3 ja R_4 on CO_2H ;
25

E) hydrolysoidaan vaiheessa A saatu tuote, jossa Z on NHC(O)CH_3 , DCl:n D_2O -liuoksella kuumentaen, jolloin saadaan kaavan I, II tai III mukaisia tuotteita, joissa Z on NH_2 ; ja
30

F) saatetaan missä tahansa vaiheessa A - E valmistettu tuote, jossa Z on NH_2 , reagoimaan tiofosgeenin kanssa, jolloin saadaan kaavan I, II tai III mukaisia tuotteita, joissa Z on isotiosyanaattiryhmä.

Edellä esitettyjen eri vaiheiden yhteydessä käytettävät reaktio-olosuhteet ja reagenssit ovat seuraavat. Kun lämpötila on "korkeintaan 20 °C", tämä saadaan yleensä aikaan käyttämällä jää-vesihaudetta. "Kuumennus" tehdään joko keittämällä palautusjäähdyttäjän alla tai huoneen lämpötilan yläpuolella. Edullinen "emäs" on natriumhydroksidi, mutta mikä tahansa emäs, joka pystyy pitämään yllä halutun pH-arvon vaikuttamatta haitallisesti reaktiotuoteseen, on hyväksyttävä. "Sopiva liuotin" on inertti ja pystyy liuottamaan reagoivat aineet; esimerkkejä tällaisista liuottimista ovat vesi ja alkoholit, kuten metanoli. Haluttu tuote voidaan erottaa millä tahansa tavanomaisilla menetelmillä, esimerkiksi saostamalla liuottimesta, kuten asetonista.

Kaavojen I, II ja III mukaiset kompleksit valmistetaan tavanomaisin menetelmin, esimerkiksi saattamalla kelaatinmuodostaja reagoimaan metallin kanssa sellaisissa olosuhteissa, että kelaatinmuodostaja kompleksoi metallin. Kelaatinmuodostajaa on usein ylimäärin metalliin nähden.

Kaavojen I, II ja III mukaisia konjugaatteja valmistetaan tavanomaisin menetelmin, esimerkiksi liittämällä kompleksi kovalenttisesti vasta-aineeseen tai vasta-ainefragmenttiin.

Keksintöä valaistaan tarkemmin seuraavin esimerkein, jotka on tarkoitettu ainoastaan esimerkinomaisesti kuvaamaan keksinnön käyttöä. Yleisen kaavan I mukaisten yhdisteiden rakenteita esitetään taulukossa I.

Lähtöaineiden valmistus

Esimerkki A

Epäsymmetrisen etyleenidiamiinidietikkahapon valmistus

Deionisoitu vesi (60,6 g), 98-%:inen N-asetyylietyleenidiamiini (20,4 g, 0,2 mol) ja bromietikkahappo (55,7 g, 0,40 mol) lisättiin reaktioastiaan ja jäähdytettiin jää-vesihauteessa. Seoksen pH säädettiin sekoittaen

suunnilleen arvoon 8,1 25-%:isella natriumhydroksidiliuok-
sella. Seoksen lämpötila pidettiin alle 20 °C:na emäksen
lisäämisen aikana. Jää-vesihaude poistettiin ja pH pidet-
tiin alueella 7 - 8 lisäämällä 25-%:ista natriumhydroksi-
diliuosta. Lämpötila pidettiin alempana kuin 37 °C jääh-
dyttämällä ajoittain jää-vesihauteella. Reaktioseosta se-
koitettiin ja pidettiin edellä mainitussa tilassa noin 31
tuntia ja siirrettiin se sitten pyöreäpohjaiseen reak-
tiopulloon, joka oli varustettu vesijäähdytteisellä palau-
tusjäähdyttäjällä, magneettisekoitussauvalla, lämpömitta-
rilla, tiputussuppilolla ja kuumennusvaipalla. Lisättiin
natriumhydroksidiliuosta (40,1 g 50-%:ista liuosta) ja
refluksoitiin seosta noin 15 tuntia, minkä jälkeen se
jäähdytettiin ja suodatettiin käyttämällä lasisuodatinta
(medium) ja alipainetta. Suodos siirrettiin kvan-
titatiivisesti (käyttämällä deionisoitua vettä) dekantte-
rilasiin ja jäähdytettiin lämpötilaan alle 25 °C jäähau-
teessa. Lisättiin sekoittaen deionisoitua vettä (100 ml)
ja säädettiin pH suunnilleen arvoon 4 väkevällä vety-
kloridihapolla pitäen lämpötila alle 25 °C:na. Seos imu-
suodatettiin lasisuodattimella (medium). Lisättiin noin
1 200 ml etanolia suureen dekantterilasiin ja sekoitettiin
magneettisekoittimella. Edellä saatu suodos lisättiin eta-
noliin perinpohjaisesti sekoittaen. Muodostuu öljymäinen
materiaali, joka muuttuu asteittain valkeaksi kiinteäksi
aineeksi. Jatkettiin sekoitusta kaksi tuntia, minkä jäl-
keen kiinteä aine otettiin talteen käyttämällä lasisuoda-
tinta (medium) ja alipainetta. Kiinteän aineen annettiin
kuivua ilmassa noin 1,5 tuntia ja kuivattiin sitä sitten
vakuumissa lämpötilassa 55 - 60 °C muutama tunti. Saatiin
noin 42,9 g valkeaa kiinteää ainetta, joka sisälsi epä-
orgaanista suolaa, ja se identifioitiin epäsymmetriseksi
etyleenidiamiinidietikkahapoksi protoni- ja hiili-NMR:llä.

Esimerkki B2-okso-1-piperatsiini-etikkahapon, etyleenidiamiini-
dietikkahapon laktaamin, valmistus

Deionisoitu vesi (150 g), symmetrinen etyleenidiamiinidietikkahappo (25,0 g, 0,14 mol) ja väkevä vetykloridihappo (28 g) laitettiin pyöreäpohjaiseen reaktiopulloon, joka oli varustettu lämpömittarilla, lämpötilansäätimellä, vesijäähdytteisellä palautusjäähdyttimellä ja kuumennusvaipalla. Seos sekoitettiin magneettisekoittimella ja refluksoitiin 4 tuntia ja jäähdytettiin. Seos imusuodatettiin lasisuodatinupokkaalla (medium). Suodoksen pH säädettiin suunnilleen arvoon 1,5 50-%:isella natriumhydroksidiliuoksella ja imusuodatettiin lasisuodattimella (medium). Suodoksen pH säädettiin arvoon noin 5 50-%:isella natriumhydroksidiliuoksella ja poistettiin haihtuvat aineet alipaineessa lämpötilassa 60 - 70 °C:ssa. Kiinteä aine kuivattiin vakuumiuunissa lämpötilassa 55 - 60 °C muutama tunti. Symmetrisen etyleenidiamiinidietikkahapon laktaamin muodostaminen varmistettiin protoni- ja hiili-NMR:llä.

Esimerkki C2-okso-1,4-piperatsiini-etikkahapon, etyleenidiamiini-
nitrietikkahapon laktaamin, valmistus

Noin 40,8 g esimerkin B mukaisesti valmistettua 2-okso-1-piperatsiini-etikkahappoa ja 70 g deionisoitua vettä laitettiin dekantterilasiin ja sekoitettiin muutama tunti magneettisekoittimella. Seos imusuodatettiin lasisuodattimella (medium). Suodos ja 20,0 g bromietikkahappoa lisättiin dekantterilasiin ja sekoitettiin, kunnes bromietikkahappo liukene kokonaan. pH säädettiin suunnilleen arvoon 7 25-%:isella natriumhydroksidiliuoksella. Lämpötila pidettiin alle 25 °C:na emäksen lisäyksen aikana jäähdyttämällä jää-vesihauteessa. Jää-vesihaude poistettiin ja seosta sekoitettiin noin 4 - 5 tuntia suunnilleen 35 °C lämpötilassa 35 °C pitäen pH suunnilleen arvossa 7 lisää-

mällä ajoittain 25-%:ista natriumhydroksidiliuosta. Reaktioseoksen annettiin seistä muutama tunti ja väkevöitiin se sitten alipaineessa suunnilleen painoon 90 - 100 g ja imusuodatettiin lasisuodattimella (medium). Haihtuvat aineet poistettiin alipaineessa suodoksesta lämpötilassa 55 - 60 °C ja materiaalia kuivattiin vakuumiuunissa lämpötilassa 55 - 60 °C muutama tunti. Etyleenidiamiinitrietikkahapon rakenne varmistettiin protoni- ja hiili-NMR:llä.

Esimerkki D

10 Trinatriumetyleenidiamiinitrietikkahapon valmistus

Noin 44,5 g esimerkin C mukaisesti valmistettua 2-okso-1,4-piperatsiinidietikkahappoa ja 280 g deionisoitua vettä lisättiin dekantterilasiin ja sekoitettiin, kunnes laktaami liukeni kokonaan. Lisättiin NaOH-liuosta (110 g, 50-%:ista) sekoittaen. Lämpötila pidettiin alle 25 °C:na jäähdyttämällä jäähauteessa. Sitten tehtiin hydrolyysi upottamalla liuosta sisältävät putket vesihauteeseen, jonka lämpötila oli säädetty arvoon 87 °C. 15 min:n kuluttua liuokset poistettiin ja jäähdytettiin jää-vesihauteessa. Protoni- ja hiili-NMR-analyysi vahvisti trinatriumetyleenidiamiinitrietikkahapon läsnäolon emäksisessä hydrolyysiväliaineessa.

Esimerkki E

4-dietyleenitriamiinietikkahapon valmistus

25 Vesijäähdytteisellä palautusjäähdyttimellä, magneettisekoittimella ja lämpömittarilla varustettuun pulloon lisättiin 75,0 g ftaalihappoanhydridiä, 350,5 g etikkahappoa ja 26,0 g dietyleenitriamiinia. Seosta sekoitettiin suunnilleen lämpötilassa 116 °C 1,5 tuntia ja jäähdytettiin se sitten. Haihtuvat aineet poistettiin alipaineessa lämpötilassa 65 - 70 °C, kunnes paino oli 218 g. Seos kaadettiin etanoliin (600 g) sekoittaen. Kahden tunnin kuluttua kiinteä aine erotettiin imusuodattamalla lasisuodattimella (medium). Kiintoaine pestiin kahdesti etanolilla (500 ml) ja kuivattiin sitten vakuumiuunissa läm-

pötilassa 60 - 65 °C. Saatiin noin 66 g diftaloyyliyhdistemateriaalia.

Diftaloyyliyhdisteen etyyliesteri valmistettiin lisäämällä 65,6 g edellä valmistettua diftaloyyliyhdistettä, 17,7 natriumkarbonaatilla ja 800 ml etanolia pulloon, joka oli varustettu vesijäähdytteisellä palautusjäähdyttimellä, tiputussuppilolla, mekaanisella sekoittimella ja lämpömittari-termostaattiyhdistelmällä. Lisättiin 51,0 g etyylibromiasetaattia 15 min:n aikana seokseen sekoittaen ja refluksoititiin sitten 16 tuntia. Etanolia (200 ml) poistettiin tislamalla käyttäen Dean-Stark-loukua ja jäljelle jäänyt reaktioseos jäähdytettiin lämpötilaan alle 5 °C lisäämällä jäämurskaa. Seosta jäähdytettiin vielä 5 tuntia jäähauteessa ja suodatettiin se sitten lasisuodattimella (medium). Kiinteä aine pestiin kahdesti etanolilla ja kuivattiin vakuumiuunissa lämpötilassa 65 - 70 °C. Saatiin noin 81 g 1,7-diftaloyyli-4-dietyleenitriamiiniasetaattia. Seokseen, joka sisälsi 30,32 g vettä ja 76,4 g väkevää vetykloridihappoa, liuotettiin 20,1 g (0,045 mol) etyyli-1,7-diftaloyyli-4-dietyleenitriamiiniasetaattia kuumentaen lämpötilaan 93 °C ja seosta pidettiin tässä lämpötilassa 6,5 tuntia. Tuloksena oleva valkea sakka suodatettiin ja pestiin vedellä. Yhdistetyt suodokset väkevöitiin alipaineessa lämpötilassa 60 °C, jolloin saatiin valkea kiinteä aine. NMR-analyysi osoitti, etteivät ftaloyyliryhmät olleet hydrolysoituneet täydellisesti. Nämä kaksi kiinteää ainetta yhdistettiin sitten ja lisättiin väkevään vetykloridihappoon käyttämällä pieni määrä vettä. Lietettä refluksoititiin sitten 6 tuntia, jäähdytettiin se huoneen lämpötilaan ja suodatettiin, jolloin saatiin 12,3 g ftaalihappoa. Sitten suodos haihdutettiin alipaineessa, jolloin saatiin 13,9 g keltaista kiinteää tuotetta. Tuote liuotettiin veteen lisäämällä 6 g 50-%:ista natriumhydroksidia ja käsiteltiin aktiivihiehillä lämpötilassa 100 °C, minkä jälkeen se suodatettiin ja

haihdutettiin alipaineessa, jolloin saatiin 15,2 g 4-di-
etyleenitriaminietikkahappoa.

Lopputuotteen valmistus

Esimerkki 1

- 5 2-[(2-{[bis(karboksimetyyli)]amino}etyyli)amino]-2-
 (5-asetamido-2-hydroksifenyyli)etaanihapon valmis-
 tus
- 10 Deionisoitu vesi (10,3 g), 98-%:inen 4-asetamido-
 fenoli (15,1 g, 0,1 mol), 50-%:inen glyoksyylihappo
 (14,8 g, 0,1 mol) ja metanoli (50,5 g) lisättiin dekantte-
 rilasiin ja sekoitettiin magneettisekoittimella. Lisättiin
 esimerkin A mukaisesti valmistettu epäsymmetrinen ety-
 leenidiamiinidietikkahappo (19,5 g) ja seos jäähdytettiin
 jää-vesihauteessa. Seoksen pH säädettiin sekoittaen suun-
 nilleen arvoon 8,0 50-%:isella natriumhydroksidiliuoksel-
 la. Seoksen lämpötila pidettiin alle 20 °C:na emäksen li-
 säyksen aikana. Jää-vesihaude poistettiin, seoksen pH sää-
 dettiin arvoon 8,7 ja sitä sekoitettiin noin 2 tuntia läm-
 pötilassa 25 - 32 °C. Seos siirrettiin vesijäähdytteisellä
 palautusjäähdyttäjällä, magneettisekoitussauvalla, lämpö-
 mittarilla ja kuumennusvaipalla varustettuun pyöreäpohjai-
 seen reaktiopulloon. Seosta pidettiin sekoittaen lämpöti-
 lassa 70 °C 8 tuntia, jäähdytettiin sitten ja imusuodatet-
 tiin lasisuodattimen läpi (medium). Kiinteän aineen annet-
 tiin kuivua ilmassa 7 tuntia ja sitä kuivattiin sitten
 25 vakuumiuunissa lämpötilassa 55 - 60 °C muutama tunti. Saa-
 tiin noin 29,6 g kiinteää ainetta. Sitten materiaali se-
 koitettiin asetonin (300 g) kanssa ja suodatettiin vesi-
 suihkupumpulla ainkaansaadun alipaineen avulla lasisuodat-
 timen (medium) läpi. Kiinteä aine pestiin uudelleen aseto-
 nilla (300 g), kuivattiin ilmassa ja laitettiin sitten 1
 30 tunniksi vakuumiuuniin lämpötilaan 55 - 60 °C. Saatiin
 noin 26,7 g 2-[(2-{[bis(karboksimetyyli)]amino}etyyli)ami-
 no]-4-(5-asetamido-2-hydroksifenyyli)etaanihapon natrium-
 35 suolaa. Tämä kiinteä aine ja 180 g deionisoitua vettä lai-

tettiin dekantterilasiin ja sekoitettiin magneettisekoittimella. pH säädettiin arvoon 2,2 väkevällä vetykloridihapolla, jolloin tuotteen happomuoto alkoi saostua liuoksesta. Tuote otettiin talteen suodattamalla ja pestiin deionisoidulla vedellä (noin 150 g). Tuote, 2-[(2-{[bis(karboksimetyyli)]amino}etyyli)amino]-2-(5-asetamido-2-hydroksifenyyli)etaanihappo, kuivattiin muutama tunti vakuumiuunissa lämpötilassa 55 - 60 °C. Saatiin noin 142,2 g tuotetta. Tuotteen rakenne varmistettiin protoni-NMR:llä. (Katso taulukko I.)

Esimerkki 2

2-[(2-{[bis(karboksimetyyli)]amino}etyyli)(karboksimetyyli)amino]-2-[5-asetamido-2-(karboksimetyloksi)fenyyli]etaanihapon valmistus

Deionisoitu vesi (4,5 g), bromietikkahappo (2,0 g) ja esimerkin 1 mukaisesti valmistettu 2-[(2-{[bis(karboksimetyyli)]amino]-2-(5-asetamido-2-hydroksifenyyli)etaanihappo (2,5 g) laitettiin pieneen reaktioastiaan ja jäähdytettiin jäävesihauteessa. Seoksen pH säädettiin sekoittaen 25-%:isella natriumhydroksiliuoksella suunnilleen arvoon 9,3. Seoksen lämpötila pidettiin 20 °C:n alapuolella emäksen lisäyksen aikana. Jää-vesihau-
de poistettiin ja seosta sekoitettiin 48 tuntia lämpötilassa 35 - 40 °C pitäen pH alueella 10,5 - 11,5 lisäämällä ajoittain 25-%:ista natriumhydroksidiliuosta. Osa reaktioseoksesta (10,2 g) lisättiin dekantterilasiin ja sekoitettiin magneettisekoittimella. Liuokseen lisättiin 125 g asetonia 15 min:n aikana, jolloin erottui öljy. Asetoniosa poistettiin dekantoimalla ja lisättiin saostumaan vielä 50 g asetonia, sekoitettiin ja poistettiin asetonikerros. Öljy kuivattiin ilmassa ja sitten vakuumiuunissa lämpötilassa 60 - 65 °C kaksi tuntia, jolloin saatiin mureneva keltainen kiinteä aine. Tuote puhdistettiin anioninvaihtokromatografisesti pylväässä (15 x 500 mm) käyttämällä massana Q-Sepharosea™ (Pharmacia Inc.) ja eluenttina muu-

5 rahaishappogradienttia 0 → 30 % kahden tunnin kuluessa nopeudella 3 ml/min ja otettiin talteen fraktiot. Fraktioita seurattiin UV-absorptiolla ja asianmukaiset fraktiot yhdistettiin ja kylmäkuivattiin, jolloin saatiin haluttu tuote. (Katso taulukko I.)

Esimerkki 3

10 2-[(2-[[bis(karboksimetyyli)]amino}etyyli)(karboksimetyyli)amino]-2-[5-amino-2-(karboksimetyloksi)fenyyli]etaaninapon pentanatriumsuolan valmistus

Noin 40 mg esimerkin 2 mukaisesti valmistettua 2-[(2-[[bis(karboksimetyyli)]amino}etyyli)(karboksimetyyli)amino]-2-[5-asetamido-2-(karboksimetyloksi)fenyyli]etaanihappoa liuotettiin D₂O:hon ja säädettiin pH arvoon 13 NaOD:n D₂O-liuoksella. N-asetyyli-ryhmän hydro-
15 lysoituminen vastaavaksi funktionaaliseksi aniliiniryhmäksi tapahtui huoneen lämpötilassa, ja sitä seurattiin protoni-NMR:llä, joka vahvisti rakenteen. (Katso taulukko I.)

Esimerkki 4

20 2-[2(2-[[bis(karboksimetyyli)]amino}etyyli)(syanometyyli)amino]-2-(5-asetamido-2-hydroksifenyyli)etaaninapon valmistus

3,1 g deionisoitua vettä ja 2,5 g esimerkin 1 mukaisesti valmistettua 2-[(2-[[bis(karboksimetyyli)]amino}etyyli)amino]-2-(5-asetamido-2-hydroksifenyyli)etaanihappoa lisättiin pieneen astiaan ja jäähdytettiin jää-vesihauteessa. pH säädettiin arvoon 9,8 - 9,9 25-%:isella natriumhydroksidiliuoksella. Seoksen lämpötila pidettiin alempana kuin 20 °C emäksen lisäyksen aikana. Jää-vesihaute poistettiin ja lisättiin sekoittaen
25 1,0 g 40 % glykolinitriiliä sisältävää vesiliuosta ja säädettiin pH arvoon 9,9 - 10,0 25-%:isella natriumhydroksidiliuoksella. Seos siirrettiin pieneen reaktiopulloon, joka oli varustettu lämpötilansäätimen sisältävällä lämpömittarilla, vesijäähdytteisellä palautusjäähdyttäjällä ja
30 kuumennusvaipalla. Reaktioseosta sekoitettiin magneet-

tisekoittimella lämpötilassa 49 - 50 °C 8 tuntia, jäähdytettiin ja annettiin seistä huoneen lämpötilassa 72 tuntia. Osa reaktioseoksesta (8,5 g) laitettiin dekantterilaasiin ja sekoitettiin magneettisekoittimella. Lisättiin 5 liuokseen 146 g asetonia 10 min:n aikana, jolloin saostui kiinteä aine. Asetoniosa poistettiin dekantoimalla, lisättiin sakkaan vielä 50 g asetonia, sekoitettiin ja poistettiin asetonikerros. Materiaalia kuivattiin noin 4 tuntia vakuumiuunissa lämpötilassa 60 - 65 °C. Saatiin noin 2,9 g 10 tuotetta. Protoni-NMR tuki halutun aminoasetonitriilijohdannaisen läsnäoloa. (Katso taulukko I.)

Esimerkki 5

2-[(2-{[bis(karboksimetyyli)]amino}etyyli)(karboksimetyyli)amino]-2-(5-amino-2-hydroksifenyyli)etaanihapon valmistus 15

Noin 1,0 g esimerkin 4 mukaisesti valmistettua 2-[(2-{[bis(karboksimetyyli)]amino}etyyli)(syanometyyli)amino]-2-(5-asetamido-2-hydroksifenyyli)etaanihappoahydrolysoitiin happamissa olosuhteissa, jolloin funktionaalinen 20 aminoasetonitriiliryhmä muuttui vastaavaksi asetaattiryhmäksi ja N-asetyyliiryhmä aniliiniryhmäksi. Aminoasetonitriiliyhdiste, 2,2 g D₂O:ta ja 7,8 g 20-%:ista DCl-liuosta lisättiin lasiputkeen. Putki laitettiin lämpötilassa 88 - 89 °C olevaan termostaattiohjattuun vesihauteeseen 25 kaikkiaan 33 min:n ajaksi, poistettiin ja jäähdytettiin. Hydrolyysiä seurattiin protoni-NMR:llä. Liuos kylmäkuivattiin, jolloin saatiin 1,3 g kiintoainetta. Tuote puhdistettiin anioninvaihdolla (Q-Sepharose™) pylväässä (15 x 500 mm) eluoiden etikkahappogradientilla 0 → 1 mol/l 30 tunnin aikana nopeudella 3 ml/min ja ottaen talteen 6 ml:n fraktioita. Fraktioita seurattiin UV-absorptiolla, ja asianmukaiset fraktiot yhdistettiin ja kylmäkuivattiin, jolloin saatiin haluttua tuotetta. (Katso taulukko I.)

Esimerkki 6

2-[bis(2-{{bis(karboksimetyyli)}amino}etyyli)amino]-2-[5-asetamido-2-(karboksimetyloksi)fenyyli]-etaanihapon ja 2-{{2-[(2-{{bis(karboksimetyyli)}amino}etyyli)(karboksimetyyli)amino]etyyli} (karboksimetyyli)amino]-2-[5-asetamido-2-(karboksimetyloksi)fenyyli]etaanihapon valmistus

24,8 g deionisoitua vettä, 15,1 g (0,1 mol) 98-%:ista 4-asetamidofenolia ja 14,8 g glyoksyylihapon 50-%:ista vesiliuosta (0,1 mol) laitettiin dekantterilasiin ja jäähdytettiin jää-vesihauteessa. Seoksen pH säädettiin arvoon 3,3 25-%:isella natriumhydroksidiliuoksella pitäen lämpötila alle 20 °C:na. Siten lisättiin 9,8 g DETA:ta. Myös tällöin lämpötila pidettiin alempana kuin 20 °C jäähdyttämällä jää-vesihauteessa. pH oli DETA:n lisäämisen jälkeen noin 10,2. Seos siirrettiin lämpömittarilla, lämpötilansäätimellä, vesijäähdytteisellä palautusjäähdyttäjällä ja kuumennusvaipalla varustettuun reaktiopulloon. Reaktioseosta sekoitettiin magneettisekoittimella lämpötilassa 75 °C noin 7 tuntia ja jäähdytettiin sitten. Lisättiin 1 400 g asetonia suureen dekantterilasiin ja sekoitettiin magneettisekoittimella. Lisättiin noin 40 g edellä valmistettua reaktioliuosta 10 min:n aikana, jolloin saostui kiinteää ainetta. Asetoniosa poistettiin dekantoimalla ja lisättiin vielä 1 460 g asetonia ja kiinteää ainetta trituroitiin ja sekoitettiin perusteellisesti asetonissa. Kiinteä aine otettiin talteen imusuodattamalla lasisuodattimen (medium) läpi. Kiinteä aine pestiin runsaalla määrällä asetonia ja kuivattiin sitä sitten muutama tunti vakuumiuunissa lämpötilassa 60 - 65 °C. Saatiin noin 7,8 g kiinteää ainetta; protoni-NMR osoitti DETA-yhdisteen haluttujen isomeerien seoksen.

5,3 g deionisoitua vettä ja 4 g edellä eristettyä kiinteää ainetta laitettiin dekantterilasiin ja sekoitettiin magneettisekoittimella noin 3 tuntia, minkä jälkeen

kiinteä aine oli kokonaan liuennut. Lisättiin sekoittaen 10,1 g bromietikkahappoa ja seos jäähdytettiin jää-vesihauteessa. Seoksen pH säädettiin suunnilleen arvoon 11 25-%:isella natriumhydroksidiliuoksella. Lämpötila pidettiin alempana kuin 20 °C emäksen lisäyksen aikana. Jäävesihaude poistettiin ja seosta sekoitettiin 50 tuntia lämpötilassa 35 - 40 °C pitäen pH suunnilleen alueella 10,5 - 11,5 lisäämällä ajoittain 25-%:ista natriumhydroksidiliuosta. Laitettiin 240 g asetonia dekantterilasiin ja sekoitettiin magneettisekoittimella. Lisättiin noin 5 g reaktioliuosta asetoniin, jolloin saostui kiinteää ainetta. Asetoniosa dekanttoitiin, lisättiin vielä 245 g asetonia, sekoitettiin ja poistettiin asetonikerros. Kiinteä aine otettiin talteen imusuodattamalla lasisuodattimen (medium) läpi. Kiinteä aine pestiin asetonilla ja kuivatettiin sitten vakuumiuunissa lämpötilassa 55 - 60 °C muutama tunti. Saatiin noin 2,6 g kiinteää ainetta. (Katso taulukko I.)

Esimerkki 7

20 2-[bis(2-[[bis(karboksimetyyli)]amino}etyyli)amino]-2-[5-amino-2-(karboksimetyloksi)fenyyli]etaanihapon ja 2-[[2-[(2-[[bis(karboksimetyyli)]amino}etyyli)(karboksimetyyli)amino]-etyyli](karboksimetyyli)amino]-2-[5-amino-2-(karboksimetyloksi)fenyyli]etaanihapon valmistus

25 Noin 376 mg esimerkin 6 mukaisesti valmistettuja 2-[bis(2-[[bis(karboksimetyyli)]amino}etyyli)amino]-2-[5-asetamido-2-(karboksimetyloksi)fenyyli]etaanihappoa ja 2-[[2-[(2-[[bis(karboksimetyyli)]amino}etyyli)(karboksimetyyli)amino]-etyyli](karboksimetyyli)amino]-2-[5-asetamido-2-(karboksimetyloksi)fenyyli]etaanihappoa liuotettiin D₂O:hon (1,0 g) ja käsiteltiin 5 pisaralla 37-%:ista DCl:a. Hapanta liuosta pidettiin sitten lämpötilassa 80 °C 2 tuntia, minkä jälkeen protoni-NMR-spektri osoitti, että käytännöllisesti katsoen kaikki asetanilidiryhmät olivat

muuttuneet aniliiniryhmiksi ja etikkahapoksi. Sitten liuos jäädytettiin hiilihapojää-asetonihauteessa ja kylmäkuivattiin yön yli, jolloin saatiin haluttua tuotetta vaalean ruskeana kiinteänä aineena. (Katso taulukko I.)

5 **Esimerkki 8**

2-[(2-[(2-[[bis(karboksimetyyli)]amino]etyyli)karboksime-
boksimetyyli]amino]etyyli)(karboksime-
tyyli)amino]-
2-[5-amino-2-(karboksime-
tyloksi)fenyyli]etaanin
hapon
valmistus

- 10 Liuotettiin veteen (40 ml) 8,0 g esimerkin E mukaisesti valmistettua 4-dietyleenitriamiinietikkahappoa ja jäädytettiin seos sitten jäähauteessa. Tähän jäädytetyyn liuokseen lisättiin 6,08 g (0,04 mol) 4-asetamidofenolia ja 5,95 g jäädytettyä liuosta, joka sisälsi 50 paino-% glyoksyylihappoa vedessä (0,04 mol). Pitäen lietteen
- 15 lämpötila alle 20 °C:nä jäähauteen avulla lisättiin 2,5 ml 50-painoprosenttista natriumhydroksidiliuosta. Tuloksena oleva liete, jonka pH oli 8,75, kuumennettiin hitaasti lämpötilaan 80 °C, sekoitettiin sitä sitten tässä lämpötilassa 4,5 tuntia ja annettiin sitten jäähtyä yön yli. Sitten liuos jäädytettiin alipaineessa noin 25 ml:ksi ja lisättiin asetoniin (300 ml). Asetoni erotettiin tuloksena olevasta kiinteästä aineesta dekantoimalla. Kiinteä aine pestiin muutaman kerran asetonilla ja kuivattiin, jolloin saatiin 26,1 g tummaa tahmeaa kiinteää tuotetta.
- 25 26,05 g tätä kiinteää ainetta liuotettiin veteen (50 ml). Tähän liuokseen liuotettiin 26,7 g (0,192 mol) bromietikkahappoa. Tuloksena oleva liuos jäädytettiin jäähauteessa, säädettiin pH-arvoon 10,5 50-painoprosenttisella natriumhydroksidiliuoksella, annettiin lämmitä huoneen lämpötilaan ja kuumennettiin sitten lämpötilaan 46 °C. Seos pidettiin lämpötilassa 46 °C ja pH arvossa 10,5 lisäämällä noin 23 tuntia 50-painoprosenttista natriumhydroksidiliuosta. Sitten tilavuus pienennettiin 50 ml:ksi alipaineessa. Väkevöity liuos lisättiin asetoniin (500 ml)
- 30
- 35

voimakkaasti sekoittaen ja syntyneen sakan annettiin laskeutua. Asetoni dekantoitettiin ja lisättiin vielä 400 ml asetonia, sekoitettiin voimakkaasti ja dekantoitettiin siten. Viimeinen pesu tehtiin samalla tavalla käyttämällä 100 ml asetonia. Kiinteä aine kuivatettiin alipaineessa, jolloin saatiin 52,55 g murenevaa ruskeaa kiinteää ainetta. 2,00 g tätä ruskeaa kiinteää ainetta liuotettiin veteen (20 ml) ja käsiteltiin väkevällä vetykloridihapolla 1,48 g. Tätä liuosta pidettiin lämpötilassa 80 °C, kunnes protoni-NMR osoitti N-asetyyli-ryhmittymän täydellisen hydrolysoitumisen. Liuos kylmäkuivatettiin sitten, jolloin saatiin 2,13 g ruskeaa kiinteää ainetta, joka sisälsi otsikon mukaista tuotetta. (Katso taulukko I.)

Esimerkki 9

2-[[2-[[2-[[2-[[bis(karboksimetyyli)]amino]etyyli)-(karboksimetyyli)amino]etyyli)-(karboksimetyyli)amino]etyyli)-(karboksimetyyli)amino]-2-[5-asetamido-2-(karboksimetyloksi)fenyyli]etaanihapon ja 2[[2-[[2-[[bis(karboksimetyyli)]amino]etyyli)-(karboksimetyyli)amino]etyyli)-(2-[[bis(karboksimetyyli)]amino]etyyli)amino]-2-[5-asetamido-2-(karboksimetyloksi)fenyyli]etaanihapon valmistus

12,5 g deionisoitua vettä, 7,6 g 98-%:ista 4-asetamidofenolia ja 7,4 g 50-%:ista glyoksyylihappoliuosta laitettiin dekantterilasiin ja jäähdytettiin jää-vesihauhteessa. Seoksen pH säädettiin arvoon 3,6 25-%:isella natriumhydroksidiliuoksella pitäen lämpötila alempana kuin 20 °C. Lisättiin 7,2 g lineaarista trietyleenitetra-amiinia pitäen lämpötila alempana kuin 20 °C. pH oli trietyleenitetra-amiinin lisäämisen jälkeen noin 10,6. Seos siirrettiin lämpötilansäätimen sisältävällä lämpömittarilla, vesijäähdytetteisellä palautusjäähdyttimellä ja kuumennusvaipalla varustettuun reaktiopulloon. Reaktioseosta sekoitettiin magneettisekoittimella lämpötilassa 80 - 83 °C 4,5 tuntia ja jäähdytettiin sitten. Laitettiin de-

kantterilasiin 175 g asetonia ja sekoitettiin magneet-
 tisekoittimella. Lisättiin noin 12 g reaktioliuosta, jol-
 loin erottui öljy. Asetoniosa poistettiin dekantoimalla ja
 lisättiin vielä 175 g asetonia ja jatkettiin sekoittamis-
 5 ta. Asetoniosa poistettiin ja sakkaa kuivattiin vakuumi-
 uunissa lämpötilassa 60 - 65 °C muutama tunti. Otettiin
 talteen noin 3,1 g kiinteää ainetta. Kiinteä aine lietet-
 tiin sitten asetoniin (100 g), sekoitettiin perusteel-
 lisesti ja suodatettiin alipaineen avulla lasisuodattimen
 10 (medium) läpi. Kiinteä aine pestiin sitten vielä asetonil-
 la (250 ml) ja kuivattiin uudelleen vakuumiuunissa lämpö-
 tilassa 60 - 65 °C noin 4 tuntia. Saatiin noin 2,0 g mate-
 riaalia; protoni-NMR osoitti, että läsnä oli trietyleenii-
 tetra-amiini-isomeerin seosta.

15 2,0 g deionisoitua vettä ja 1,86 g edellä mainittua
 kiinteää tuotetta laitettiin dekantterilasiin ja sekoitet-
 tiin tunti, jolloin suurin osa kiinteästä aineesta liuke-
 ni. Lisättiin sekoittaen 5,0 g bromietikkahappoa ja seos
 jäähdytettiin jää-vesihauteessa. Seoksen pH säädettiin
 20 suunnilleen arvoon 10,5 ja pidettiin 47 tuntia lämpötilas-
 sa 35 - 40 °C pitäen pH alueella 10,5 - 11,5 lisäämällä
 ajoittain 25-%:ista natriumhydroksidiliuosta. Dekantteri-
 lasiin lisättiin 130 g asetonia ja sekoitettiin magneet-
 tisekoittimella. Asetoniin lisättiin noin 10,8 g reak-
 25 tioliuosta, jolloin saostui kiinteä aine. Asetoniosa de-
 kantoitiin ja lisättiin sakkaan vielä 150 g asetonia, se-
 koitettiin ja poistettiin asetonikerros. Kiinteää ainetta
 kuivattiin vakuumiuunissa lämpötilassa 60 - 65 °C muutama
 tunti. Saatiin noin 7,2 g kiinteää ainetta. (Katso tauluk-
 30 ko I.)

Esimerkki 10

2,6-bis{[bis(karboksimetyyli)amino](karboksi)me-
 tyyli}-4-(asetamido)fenolin valmistus

Dekantterilasiin laitettiin 38,6 g 98-%:ista 4-
 35 asetamidofenolia, 35,3 g 98-%:ista iminodietikkahappoa,

150 ml metanolia, 38,5 g 50-%:ista glyoksyylihapon vesiliuosta ja 30 g deionisoitua vettä. Seos jäähdytettiin jää-vesihauteessa ja pH säädettiin suunnilleen arvoon 9,4 sekoittaen 50-%:isella natriumhydroksidiliuoksella. Lämpötila pidettiin emäksen lisäämisen aikana alempana kuin 30 °C. Seos siirrettiin vesijäähdytteisellä palautusjäähdyttäjällä, lämpömittarilla ja kuumennusvaipalla varustettuun reaktiopulloon. Reaktioseos kuumennettiin suunnilleen lämpötilaan 74 - 76 °C ja seurattiin pH-arvoa ja pidettiin se alueella 8,7 - 9,5 lisäämällä ajoittain 50-%:ista natriumhydroksidiliuosta. Seosta pidettiin tässä lämpötilassa kaikkiaan 18 tuntia. Tänä aikana lisättiin noin 40 g deionisoitua vettä. Jäähdytyksen jälkeen reaktioseos suodattettiin alipaineen avulla lasisuodattimen (medium) läpi. Suodokseen lisättiin 75 g deionisoitua vettä ja poistettiin metanoli alipaineessa huoneen lämpötilassa (noin 20 - 25 °C). Liuoksen annettiin seistä muutama tunti ja saostunut kiinteä aine poistettiin liuoksesta imusuodattamalla lasisuodattimen (medium) läpi. Sekoitettiin perusteellisesti noin 30 g suodosta ja 15 g etyylietteriä ja erotettiin sitten eetterikerros. Menettely toistettiin käyttäen ensin 15 g ja sitten 10 g etyylietteriä. Vesikerroksen pH säädettiin vetyklordihapon vesiliuoksella suunnilleen arvoon 0,5 ja haihtuvat aineet poistettiin alipaineessa lämpötilassa 50 - 55 °C. Saatiin noin 13,5 g kiinteää ainetta. Kiinteään aineeseen lisättiin 75 g metanolia ja liukenemattomat suolat poistettiin suodattamalla. Metanoli poistettiin alipaineessa ja jäljelle jäänyttä kiinteää ainetta kuivattiin vakuumiuunissa lämpötilassa 70 - 70 °C muutama tunti. Tuote, joka sisälsi vielä jonkin verran epäorgaanista suolaa, analysoitiin protoni-NMR:llä ja sen havaittiin olevan pääasiassa bis-substituoitua tuotetta. (Katso taulukko I).

Esimerkki 11

2,6-bis{[(2-{[2-{[bis(karboksimetyyli)]amino}etyyli)(karboksimetyyli)]aminometyyli}-4-(asetamido)fenolin valmistus

- 5 Esimerkin D mukaisesti valmistettu emäksinen tri-natriumetyleenidiamiinitrietikkahappoliuos jäähdytettiin jäähauteessa ja lisättiin sekoittaen vetykloridihappoa, niin että pH muuttui suunnilleen arvoon 13,8. Lämpötila pidettiin alempana kuin 35 °C hapon lisäyksen aikana.
- 10 Haihtuvia aineita poistettiin alipaineessa huoneen lämpötilassa, niin että painoksi tuli 210 g. Kiinteä aine poistettiin imusuodattamalla lasisuodattimen (medium) läpi. Suodos siirrettiin 25 ml:n pyöreäpohjaiseen pulloon, joka oli varustettu vesijäähdytteisellä palautusjäähdyttäjällä,
- 15 magneettisekoittimella, lämpömittarilla, lämpötilansäätimellä, kuumennusvaipalla ja tiputussuppilolla. pH säädettiin suunnilleen arvoon 11 vetyklordihapolla. Lämpötila pidettiin alempana kuin 30 °C hapon lisäyksen aikana. Seos kuumennettiin suunnilleen lämpötilaan 40 °C ja lisättiin
- 20 11,6 g formaldehydin 37-%:ista vesiliuosta 35 min:n aikana. Reaktioseosta sekoitettiin ja kuumennettiin vielä 30 min ja jäähdytettiin sitten. Liuoksen pH säädettiin 25-%:isella natriumhydroksidiliuoksella suunnilleen arvoon 9,8 ja siirrettiin liuos tiputussuppiloon. Dekantterilasiin laitettiin 10,3 g 98-%:ista 4-asetamidofenolia,
- 25 25,2 g deionisoitua vettä ja 9,5 g 25-%:ista natriumhydroksidiliuosta. Seosta sekoitettiin, kunnes liukeneminen oli täydellistä. Liuos siirrettiin edellä kuvatulla tavalla varustettuun pyöreäpohjaiseen reaktiopulloon ja
- 30 aloitettiin kuumennus ja sekoitus. Seos kuumennettiin suunnilleen lämpötilaan 65 °C ja lisättiin sitten edellä valmistettu formaldehydiadditiotuoteliiuos pisaroittain noin tunnin aikana. Reaktioseosta sekoitettiin ja pidettiin lämpötilassa 65 °C vielä 12 tuntia ja jäähdytettiin
- 35 se sitten. Laitettiin 150 g asetonia dekantterilasiin ja

sekoitettiin magneettisekoittimella. Asetoniin lisättiin noin 10 g epäpuhdasta reaktioseosta, jolloin erottui öljymäistä materiaalia. Asetoniosa dekantoitiin ja lisättiin sakkaan vielä 150 g asetonia, sekoitettiin ja poistettiin asetonikerros. Materiaalia kuivattiin muutama tunti vakuumiuunissa lämpötilassa 55 - 60 °C. Saatiin noin 3,1 g kiinteää ainetta. Noin 165 mg kiinteää ainetta liuotettiin mahdollisimman pieneen määrään vettä, laitettiin seos Q-Sepharosella™ (Pharmacia Inc.) täytetylle pylväälle (1,5 x 50 cm, asetaattimuodossa) ja eluoitiin kahden tunnin ajan ammoniumasetaatigradientilla $0 \rightarrow \text{mol/l}$ nopeudella 2 ml/min. Tarkkailtiin absorbanssia aallonpituudella 300 nm. Tuote oli kolmannessa suuressa piikissä. Tämä eristettiin ja kylmäkuivattiin, jolloin saatiin 36,4 mg kiinteää ainetta, joka karakterisoitiin, jolloin saatiin 36,4 mg kiinteää ainetta, joka karakterisoitiin protoni- ja hiili-NMR:llä ja FAB massaspektrometrialla 2,6-bis{[(2-{[bis(karboksimetyyli)]amino}etyyli)(karboksimetyyli)]aminometyyli}-4-(asetamido)fenoliksi. (Katso taulukko I.)

20

Esimerkki 12

2,6-bis{[(2-{[bis(karboksimetyyli)]amino}etyyli)-
(karboksimetyyli)]aminometyyli}-4-aminofenolinval-
mistus

25

Noin 264 mg esimerkin 11 mukaisesti valmistettua 2,6-bis{[(2-{[bis(karboksimetyyli)]amino}etyyli)(karboksimetyyli)]aminometyyli}-4-(asetamido)fenolia laitettiin 5 mm:n NMR-putkeen ja liuotettiin D₂O:n (0,5 ml) ja DCl:n (0,5 ml, 20-%:inen) seokseen. NMR-putki laitettiin kuumaan vesihauteeseen (85 °C) lyhyiksi ajoiksi ja reaktion etenemistä seurattiin NMR:llä (asetamidimetyyliprotonien häviäminen ja etikkahapon ilmaantuminen). Reaktio oli mennyt loppuun 35 min:n kuluttua. Reaktioseos kylmäkuivattiin, jolloin saatiin epäpuhdasta amiinihydrokloridia tummana kiinteänä aineena. Raakatuote liuotettiin mahdollisimman pieneen määrään vettä ja laitettiin Q-Sepharose™-kolon-

35

nille (1,5 x 50 cm, asetaattimuodossa) ja eluoitiin ammoniumasetatigradientilla → 1 mol/l kolme tuntia nopeudella 2 ml/min. Tarkkailtiin absorbanssia aallonpituudella 300 nm. Tuote oli kolmannessa suuressa piikissä. Tämä eristettiin ja kylmäkuivattiin, jolloin jäljelle jäi vaa-

5 lean meripihkan värinen kiinteä aine (122 mg), joka oli halutun amiinituotteen ja ammoniumkloridin seos. Tuoteseos karakterisoitiin protoni- ja hiili-NMR:llä ja alkuaineanalyysillä. Suolapitoinen tuote (250 mg yhdistetyistä eris-

10 tä) puhdistettiin edelleen Q-Sepharosella™ (1,5 x 50 cm, formaattimuodossa) käyttämällä muurahaishappogradienttia 0 - 10 % 4 tuntia. Tarkkailtiin absorbanssia aallonpituudella 300 nm. Ensimmäinen suuri piikki sisälsi halutun tuotteen. Tämä eristettiin ja kylmäkuivattiin, jolloin

15 saatiin 8,3 mg valkeaa kiteistä ainetta. Rakenne varmistettiin protoni- ja hiili-NMR:llä ja FAB-massaspektrometrialalla. (Katso taulukko I.)

Esimerkki 13

20 2,6-bis{[(2-{[bis(karboksimetyyli)]amino}etyyli)-(karboksimetyyli)]aminometyyli}-4-(isotiosyanaatti)fenolin valmistus

Esimerkin 12 mukaisella menettelyllä valmistettu tuote, joka sisälsi 2,6-bis{[(2-{[bis(karboksimetyyli)]-amino}etyyli)-(karboksimetyyli)]aminometyyli}-4-aminofenolia ja epäorgaanista suolaa (208 mg, 15 % NH₄Cl:ssa), liu-

25 otettiin mahdollisimman pieneen määrään vettä ja johdettiin Sephadex™ G-10 suolanpoistokolonnin (Pharmacia, Inc., 1 x 35 cm) läpi. Suolaton amiini eluoitiin vedellä ja kylmäkuivattiin (11,5 mg). Amiini liuotettiin veteen (10 ml)

30 ja laitettiin pyöreäpohjaiseen reaktiopulloon. Lisättiin metyleenikloridiin (1 ml) liuotettuna tiofosgeenia (0,015 ml, 10 ekv.). Reaktioseosta sekoitettiin huoneen lämpötilassa 1 tunti. Sitten seos pestiin muutamalla annoksella metyleenikloridia ylimääräisen tiofosgeenin poistamiseksi ja vesikerros kylmäkuivattiin, jolloin saatiin

35

epäpuhdas isotiosyanaattituote, joka karakterisoitiin FAB-massaspektrometrialla. (Katso taulukko I.)

Esimerkki 14

2-([bis(karboksimetyyli)]amino)metyyli)-4-(asetamido)fenolin valmistus

Deionisoitu vesi (35,3 g), 98-%:inen iminodietikkahappo (35,3 g, 0,25 mol) ja 29,9 g 50-%:ista natriumhydroksidin vesiliuosta punnittiin pyöreäpohjaiseen vesijäähdytteisellä palautusjäähdyttäjällä, mekaanisella sekoittimella, lämpötilansäätimen sisältävällä lämpömittarilla ja tiputussuppilolla varustettuun pulloon. Seos kuumennettiin sekoittaen lämpötilaan 55 °C. 37-%:inen formaldehydin vesiliuos (21,5 g) laitettiin tiputussuppiloon ja lisättiin reaktiopulloon 15 min:n aikana. Reaktioseosta pidettiin noin 45 min lämpötilassa 55 °C, jäähdytettiin ja siirrettiin tiputussuppiloon. Edellä kuvatulla tavalla varustettuun pyöreäpohjaiseen pulloon lisättiin 38,7 g deionisoitua vettä ja 12,2 g 50-%:ista natriumhydroksidin vesiliuosta. Seos kuumennettiin sekoittaen suunnilleen lämpötilaan 65 °C ja lisättiin formaldehydi-iminodietikkahappoadditiotuoteluos 30 min:n aikana. Reaktioseosta pidettiin lämpötilassa 65 °C vielä 12 tuntia ja jäähdytettiin. Lisättiin väkevää vetykloridihappoa (55,5 g) ja reaktioseosta sekoitettiin yksi tunti. Liuoksen annettiin seistä muutama viikko, erotettiin sitten kiteinen sakka suodattamalla, pestiin deionisoidulla vedellä ja kuivatettiin vakuumiunissa lämpötilassa 65 °C muutama tunti. Saa- tiin noin 17,4 g kiinteää ainetta. Rakenne varmistettiin protoni-NMR:llä. (Katso taulukko I.)

Esimerkki 15

2-([bis(karboksimetyyli)]amino)metyyli)-6-
{([bis(karboksimetyyli)]amino)etyyli)(karboksime-
tyyli)amino)metyyli}-4-(asetamido)fenolinvalmistus

Noin 5,7 g esimerkin C mukaisesti valmistettua epäpuhdasta 2-okso-1,4-piperatsiinidietikkahappoa ja 38,6 g

deionisoitua vettä laitettiin dekantterilasiin ja sekoitettiin, kunnes laktaami liukeni. Lisättiin emäsluosta (13,5 g 50-%:ista natriumhydroksidiliuosta) pitäen lämpötila alle 30 °C:na jäädyttämällä jää-vesihauteessa. Sitten liuos siirrettiin lasiputkeen ja upotettiin putki 10 min:ksi vesihauteeseen, jonka lämpötila oli 90 °C, ja jäädytettiin sitten jää-vesihauteessa. Laktaamin muuttuminen etyleenidiamiinitrietikkahapon trinatriumsuolaksi varmistettiin protoni-NMR:llä. Emäksisen liuoksen pH säädettiin sitten suunnilleen arvoon 11,9 lisäämällä vetykloridiahappoa. Lämpötila pidettiin alempana kuin 25 °C jäädyttämällä jää-vesihauteessa. Liuosta siirrettiin reaktioastiaan ja lisättiin pisaroittain 1,5 g 37-%:ista formaldehydin vesiliuosta 20 min:n aikana. Lisättiin myös pieni määrä emäksen vesiliuosta tänä aikana pH:n säätämiseksi. Seosta sekoitettiin vielä tunti lisäten ajoittain natriumhydroksidin vesiliuosta pH:n pitämiseksi alueella 11,0 - 11,5.

Erilliseen reaktioastiaan lisättiin 1,5 g 2-({[bis-(karboksimeetyyli)]amino}metyyli)-4-(asetamido)fenolia, joka oli valmistettu esimerkin 12 mukaisesti, ja 2,5 g deionisoitua vettä. Lisättiin 25-%:ista natriumhydroksidin vesiliuosta jäädyttäen jäähauteessa, niin että pH muuttui suunnilleen arvoon 11. Edellä valmistettu formaldehydi-additiotuoteluos lisättiin sitten 30 min:n aikana fenoliyhdisteeseen suunnilleen lämpötilassa 30 °C. Reaktioseosta sekoitettiin lämpötilassa 70 °C vielä 10 tuntia ja jäädytettiin se sitten. Laitettiin 100 g asetonia dekantterilasiin ja sekoitettiin magneettisekoittimella. Asetoniin lisättiin noin 10 g epäpuhdasta reaktioseosta, jolloin saostui kumimaista ainetta. Asetoniosa dekantoitiin ja lisättiin vielä 50 g asetonia materiaaliin ja trituroitiin asetonissa. Asetonikerros poistettiin dekantoimalla ja kiinteää ainetta kuivattiin vakuumiunissa lämpötilassa 60 - 65 °C muutama tunti. Haluttu tuote erotettiin raaka-

seoksesta johtamalla kiinteän aineen vesiliuos Q-SepharoseTM-pylvään läpi ja erottamalla haluttu fraktio esimerkiksi 11 kuvatulla tavalla. (Katso taulukko I.)

Esimerkki U

- 5 N,N'di(2-hydroksi,5-asetamidobentsyyli)etyleenidi-
 amiini-N,N'-dietikkahapon valmistus (vertailu-
 esimerkki)

- Etyleenidiamiini-N,N'-dietikkahappo (10 g, 0,056 mol), deionisoitu vesi (25 g), 50-%:inen natriumhydroksidiliuos (7,0 g) ja metanoli (5,0 g) laitettiin vesijäähdytteisellä palautusjäähdyttimellä, mekaanisella sekoittimella, lämpötilansäätimen sisältävällä lämpömittarilla ja tiputussuppilolla varustettuun pyöreäpohjaiseen reaktiopulloon. Reaktioseos kuumennettiin lämpötilaan 55 °C.
- 15 37-%:inen formaldehydin vesiliuos (9,2 g, 0,11 mol) punnittiin tiputussuppiloon ja lisättiin seokseen 20 min:n aikana. Reaktioseosta pidettiin lämpötilassa 55 °C 1 tunti, jäähdytettiin se sitten ja siirrettiin toiseen tiputussuppiloon. Edellä kuvatulla tavalla varustettuun reaktiopulloon lisättiin 17,2 g 4-asetamidofenolia (0,11 mol),
- 20 36 g deionisoitua vettä, 2,0 g 50-%:ista natriumhydroksidiliuosta ja 36 g metanolia. Seos kuumennettiin lämpötilaan 65 °C ja lisättiin formaldehydin ja etyleenidiamiini-N,N'-dietikkahapon additiotuotteen vesiliuos 1 tunnin ja
- 25 15 min:n aikana. Reaktioseosta pidettiin vielä 12 tuntia lämpötilassa 64 - 65 °C ja jäähdytettiin se sitten. Osa reaktiotuotteesta väkevöitiin ja poistettiin metanoli alipaineessa. Liuoksen pH säädettiin arvon 1,5 - 2,0 vetykloridihapolla, jolloin asetyylituote saostui. Materiaali
- 30 erotettiin suodattamalla, pestiin deionisoidulla vedellä ja kuivattiin vakuumiuunissa lämpötilassa 55 - 60 °C muutama tunti. Rakenne varmistettiin protoni-NMR:llä.

Esimerkki V

N,N'-di(2-hydroksi-5-aminobentsyyli)etyylidiamiini-
N,N'-dietikkahappohydrokloridin valmistus (ver-
tailuesimerkki)

- 5 Esimerkissä U eristettyyn tuotteeseen (noin 0,9 g) lisättiin 12,5 g deionisoitua vettä ja 8 g väkevää vetykloridihappoa. Liuosta refluksoitiin sekoittaen 1 tunti pyöreäpohjaisessa reaktiopullossa. Haihtuvat aineet poistettiin alipaineessa ja amiinihydrokloridituotetta kuivatettiin vakuumiuunissa lämpötilassa 50 - 60 °C muutama tunti.
- 10 Rakenne valmistettiin protoni-NMR:llä.

Esimerkki W

Etyleenidiamiinidi[(2-hydroksi-5-asetamidofenyyli)-
etikkahapon] valmistus (vertailuesimerkki)

- 15 Glyoksyylihapon 50-%:inen vesiliuos (30,0 g, 0,20 mol), 98-%:inen 4-asetamidofenoli (30,9 g, 0,20 mol) ja deionisoitu vesi (22 g) laitettiin vesijäähdytteisellä palautusjäähdyttäjällä, mekaanisella sekoittimella ja lämpötilansäätimen sisältävällä lämpömittarilla varustettuun
- 20 pyöreäpohjaiseen reaktiopulloon. Pullo jäähdytettiin jäävesihauteella ja lisättiin hitaasti 19,0 g 50-%:ista natriumhydroksidiliuosta sekoittaen ja pitäen lämpötila alempana kuin 30 °C. Lisättiin etyleenidiamiinia (6,1 g, 0,10 mol) lämpötilassa 30 °C. Jäähaude poistettiin ja
- 25 reaktioseos kuumennettiin ja sitä sekoitettiin 5 tuntia lämpötilassa 85 - 86 °C. Noin 20 g vesipitoista reaktiotuotetta käsiteltiin etyylieetterillä (10 g). Eetterikerros poistettiin ja menettely toistettiin. Sitten vesiosan pH säädettiin suunnilleen arvoon 4,2 vety-
- 30 kloridihapolla ja sekoitettiin asetonin (35 g) kanssa. Asetonikerros poistettiin ja heitettiin pois. Jäljelle jääneeseen materiaaliin lisättiin 65 g metanolia sekoittaen. Tuloksena oleva kiinteä aine erotettiin suodattamalla ja kuivattiin muutama tunti vakuumiuunissa lämpötilassa
- 35 55 - 60 °C.

Esimerkki X**Etyleenidiamiinidi[(2-hydroksi-5-aminofenyyli)etikkahapon] valmistus (vertailuesimerkki)**

Edellä kuvattuun kiinteään aineeseen (noin 4,5 g)
 5 lisättiin 6 g deionisoitua vettä ja 21 g väkevää vety-
 kloridihappoa. Seos suodatettiin ja lisättiin 6 g vettä.
 Liuos laitettiin vesijäähdytteisellä palautusjäähdyttäjäl-
 lä, mekaanisella sekoittimella ja lämpömittarilla varus-
 tettuun pyöreäpohjaiseen reaktiopulloon. Liuosta pidettiin
 10 1 tunti lämpötilassa 100 - 103 °C ja jäähdytettiin se sit-
 ten. Haihtuvat aineet poistettiin alipaineessa ja tuote,
 etyleenidiamiinidi(2-hydroksi-5-aminofenyyli)etikkahappo-
 hydrokloridi, kuivattiin alipaineessa lämpötilassa 60 °C
 muutama tunti. Funktionaalisen asetyyli-ryhmän hydrolysoi-
 15 tumista seurattiin protoni-NMR:llä.

**Kompleksien valmistus ja prosentuaalisen komplek-
soitumisasteen määrittäminen**

Seuraavissa esimerkeissä käytetään seuraavia ter-
 mejä: kons. tarkoittaa konsentroitua, OAc asetaattiryhmää
 20 OCOCH_3 ; TLC ohutkerroskromatografiaa; ympäristön lämpötila
 huoneen lämpötilaa eli lämpötilaa noin 20 - 25 °C; yön yli
 tarkoittaa noin 9 - 18 tuntia; SP-Sephadex™ C-25 -hartsi
 on funktionaalisia sulfonihapporyhmiä sisältävä kationin-
 vaihtohartsi, jota myy Pharmacia, Inc.

25 Valmistettiin muutamien yhdisteiden yttrium- ja/tai
 samariumkomplekseja ja määritettiin prosentuaalinen komp-
 leksoitumisaste seuraavasti:

Yttriumkompleksin valmistus

Kompleksit valmistettiin tekemällä ensin veteen
 30 0,0003 mol/l yttriumia sisältävä liuos ($\text{YCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 303,26
 g/mol; $\text{Y}(\text{OAc})_3$, 12,1 % vettä). Radioaktiivista YCl_3 :a
 (Oakridge National Laboratories) lisättiin siten, että
 saatiin haluttu pulssimäärä. Lisättiin 10 µl ligandiliuos-
 ta (konsentraatio 0,03 mol/l) Y-liuokseen (990 µl), jol-
 35 loin ligandin ja metallin väliseksi suhteeksi tuli 1:1.

(Kymmenkertainen määrä ligandiliuosta käytettiin ligandi-metallisuhteen 10:1 aikaansaamiseksi.) Sitten säädettiin pH arvoon 7,4 käyttämällä joitakin mikrolitroja vetykloridihappoa tai natriumhydroksidia. Sitten liuoksesta
5 määritettiin kompleksoituneen yttriumin määrä käyttämällä seuraavaa kationinvaihtomenetelmää.

Prosentuaalisen kompleksoitumisasteen määrittäminen

Kertakäyttöinen muovinen 10 ml:n kolonni (Biorad) täytettiin vedessä turvotetulla Sephadex™ C-25 -kationinvaihtohartsilla (1 - 2 ml). Eluointi paineella siten, että vesi saatiin hartsin yläpinnan tasalle. Hartsin pinnalle lisättiin 15 µl (tai enemmän, jos pulssimäärät olivat pieniä) kompleksia. Sen jälkeen lisättiin 2 ml fysiologisen suolaliuoksen ja väkevän ammoniumhydroksidiliuoksen seosta tilavuussuhteessa 4:1 eluentiksi, jonka annettiin valua pinnan tasalle. Lisättiin vielä 2 ml eluenttia ja eluointi paineen avulla siten, että liuos poistui kokonaan, kuivattu hartsi laitettiin sitten kolmanteen laskentaputkeen ja tehtiin näille kolmelle putkelle laskenta
20 NaI-laskurilla käyttämällä tietokoneeseen kytkettyä Canberra-monikanava-analysointia. Prosentuaalinen kompleksoitumisaste määritettiin jakamalla kahden eluaatin pulssimäärä eluaattien ja kolonnin pulssimäärien summalla ja kertomalla 100:lla. Käytettäessä tätä menetelmää kompleksoitumaton yttrium jäi pylvääseen.
25

Samariumkompleksin valmistus/prosentuaalisen kompleksoitumisasteen määrittäminen

Samariumkompleksit muodostettiin edellä yttriumkompleksien yhteydessä kuvatulla tavalla, paitsi että valmistettiin 0,0003 M samariumliuos liuottamalla Sm_2O_3 (348,7 g/mol) 0,1 M vetykloridihappoon. Radioaktiivinen ^{153}Sm saatettiin 0,0003 M liuoksena 0,1 M vetykloridihapossa the University of Missouri Research Reactorista, Columbia, Missouri. Prosentuaalinen kompleksoitumisaste määritettiin samalla tavalla kuin yttriumkompleksin kohdalla. Tulokset on koottu taulukkoon II.
30
35

TAULUKKO II
Kompleksointitiedot

	Kompleksi, esimerkki- nro	Yhdiste esimer- kistä nro	Kompleksoitumis- aste (%) (suhde 10:1)	
			Y	Sm
5	16	1	98	
	17	2	> 99	
	18	2		> 99
10	19	3	> 99	
	20	4	> 99	
	21	5	99	
	22	6		> 99
	23	7		96**
15	24	8		> 99**
	25	9		> 99
	26	10	98	
20	27	11	99	
	28	11	98*	
	29	12	99	
	30	12		98
	31	12	98*	
25	32	12		98*
	33	15	99	

* Ligandin ja metallin suhde oli noin 1:1;

** Ligandin ja metallin suhde oli noin 50:1.

Esimerkit I - XV ja vertailuesimerkit A - F

Bifunktionaalisten kelaattien tutkiminen in vivo

Tiettyjen harvinaisten maametallien kelaattien stabiiliutta on korreloitu in vivo eläinkokeiden kanssa. Esimerkiksi Rosoff et al. [The International Journal of Applied Radiation and Isotopes 14 (1963) 129 - 135] kuvaavat radioaktiivisten harvinaisten maametallien tiettyjen aminokarboksyylihappokelaattien jakautumista hiirissä. Havaittu korrelaatio oli sellainen, että in vivo "kelaatinmuodostajan ja elimistön aineiden (epäorgaanisten ja orgaanisten) välinen kilpailu harvinaisesta maa-alkalimetalli-ionista määrää tämän kertymisen ja erittymisen". Harvinaisten maametallien vahvojen kelaattien otaksutaan hajoavan hyvin vähän ja erittyvän, kun taas heikot ja vahvuudeltaan keskikertaiset kelaatit hajoavat helpommin ja kerääntyvät sitten elimiin, kuten maksaan. Maksassa vallitseva radionuklidipitoisuus ei kuitenkaan aina johdu heikon kompleksin muodostumisesta vaan aiheutuu joissakin tapauksissa metallikelaatin affiniteetista maksan suhteen (katso vertailuesimerkit A ja B taulukossa III). Itse asiassa on valmistettu ja käytetty yhdisteitä maksan toiminnan tutkimiseksi [Fritzberg, Alan R., Radiopharmaceuticals: Progress and Clinical Perspectives 1, 1986; US-patenttijulkaisut 4 088 747 ja 4 091 088 (Hunt et al.)].

Määritettiin muutamien tässä esitettyjen samarium- ja/tai yttriumkelaattien biologinen jakautuminen ja käytettiin maksassa olevaa prosenttiosuutta annoksesta in vivo -tutkimusmenettelynä kelaattien stabiiliuden arvioimiseksi kvalitatiivisesti. NTA- ja EDTA-kelaatit ovat mukana vertailun vuoksi. Samariumia injektointiin myös ke-latoitumattomassa muodossa samariumkloridina.

Sprague-Dawley-rotat, jotka painoivat 150 - 200 g, ostettiin Charles River Laboratoriesilta. Nämä eläimet sijoitettiin häkkeihin ja niille annettiin vettä ja ravintoa rajoittamattomasti. Eläimiä sopeutettiin vähintään

5 vrk ennen käyttöä. Ennen kompleksin injektointia eläimet laitettiin lämpölampun alle (15 - 30 min) häntälaskimon laajentamiseksi. Sitten eläin sijoitettiin paikallaan-pitohäkkiin, häntä puhdistettiin pyyhkimällä alkoholilla ja eläimeen injektointiin 50 - 200 µl näytettä häntälaskimon kautta. Injektoinnin jälkeen eläin laitettiin toiseen häkkiin kahdeksi tunniksi, minkä jälkeen eläin lopetettiin katkaisemalla niska. Sitten eläin avattiin, osat huuhdottiin deionisoidulla vedellä, kuivattiin taputtelemalla ja punnittiin taarattuun laskentapulloon. Kaikkien injektointimäärien yhteydessä valmistettiin vähintään kolme samaa ainetta sisältävää standardia ja tehtiin niille laskenta yhdessä eläinten osien kanssa. Prosenttiosuus annoksesta on elimessä oleva pulssimäärä jaettuna standardin pulssimäärällä ja kerrottuna 100:lla (katso taulukko III).

TAULUKKO III
Biologinen jakautuminen

	Biologinen esimerkki- nro	Yhdiste esimer- kistä nro*	Metalli	Maksassa oleva osuus (%) injek- toidusta an- noksesta
5	I	1	Y	0,87
	II	2	Y	0,22
	III	3	Y	0,22
10	IV	4	Y	1,4
	V	5	Y	0,38
	VI	6	Sm	0,38
	VII	9	Sm	2,8
	VIII(10)	10	Sm	1,3
	VIII(300)	10	Sm	0,12
15	VIII(10)	10	Y	0,39
	VIII(300)	10	Ho	0,26
	IX	11	Y	0,22
	X	11	Sm	0,33
	XI	12	Y	0,28
20	XII	12	Y	0,18
	XIII	12	Sm	0,35
	XIV	12	Sm	0,26
	XV	15	Y	0,37
	(A)	U (vert.)	Sm	12
	(B)	X (vert.)	Sm	24
25	(C)	EDTA	Sm	8,4
	(D)	EDTA	Sm	4,4
	(E)	NTA	Sm	8,6
	(F)	SmCl ₃	Sm	39

*Kompleksit valmistettiin käyttämällä ligandi-metallisuhdetta 10:1 esimerkeissä I-XI, XIII ja XV; suhdetta 1:1 esimerkeissä XII ja XIV; 5:1 esimerkissä 6; ja noin 300:1 esimerkeissä D ja E.

Esimerkit XVI ja XVIII

Valmistettiin yttriumin 1:1-kompleksi 1-(p-amino-bentsyyli)dietyleenitriamiinipentaetikkahapon (ABDTPA), tunnetun kirjallisuuden mukaan käytetyn bifunktionaalisen kelaatinmuodostajan kanssa ja esimerkin 2 mukaisen ligandin (nyt esimerkki XVI) ja esimerkin 12 mukaisen ligandin kanssa (nyt esimerkki XVII) käyttämällä aiemmin kuvattua menetelmää. Sitten siirrettiin muutaman sadan mikrolitran annoksia erillisiin sentrifugiputkiin. Lisättiin ylimäärin metallia siten, että kokonaistilavuus muuttui mahdollisimman vähän, ja katsottiin aika. Puolen tunnin kuluttua metallin lisäämisestä määritettiin prosentuaalinen kompleksoitumisaste SephadexTM C-25 -menetelmällä ja verrattiin sitä alkuperäiseen kompleksimäärään. Prosentuaalinen kompleksoitumisaste lisätyn metallin funktiona antaa viitteitä ligandi-metallikompleksin labiiliudesta. Tulokset annetaan ja niitä verrataan EDTA-yttriumkompleksilla saatuihin tuloksiin alla olevassa taulukossa.

TAULUKKO IV
Kompleksitutkimus

Metallin ja ligandin välinen moolisuhde	Kompleksoitumisaste (%)			
	Esim. XVI	Esim. XVII	ABDTPA	EDTA
1	99	95	97	98
10	94	93	95	86
100	84	90	92	78
250	--	90	87	48
500	75	79	70	16

Esimerkki XVIII

Valmistettiin liuos, joka sisälsi 0,18 mol/l 1-(p-aminobentsyyli)dietyleenitriamiinipentaetikkahappoa (ABDTPA), ja identtinen liuos, joka sisälsi 0,18 mol/l
 5 esimerkin 12 mukaista ligadia, 0,5 M natriumasetaattipuskuriin, jonka pH oli 6,5. Liuokset käsiteltiin sitten 1,5 ekvivalentilla yttrium-90:ä, joka oli 0,03 mol/l yttriumkloridia sisältävänä liuoksena. Tuloksena oleva kompleksin pH oli 5 - 6. Ylimääräinen ⁹⁰Y poistettiin johtamalla
 10 kompleksin ChelexTM-hartsin läpi (Bio-Rad- Laboratories, kerroksen tilavuus 1 ml). Kompleksipitoisuus tässä puhdistetussa muodossa oli 0,0013 mol/l. Sopiva määrä liuosta lisättiin monoklonaalista vasta-ainetta CC-46 sisältävään aldehydiin ($1,7 \times 10^{-9}$ mol), niin että kompleksin ja vasta-
 15 aineen suhteeksi tuli 40:1. Noin tunnin kuluttua lisättiin 236-kertainen mooliylimäärä (vasta-aineeseen nähden) NaCNBH₃:a ja liuosten annettiin reagoida noin tunnin ajan. Tämän ajan kuluttua vasta-aine (ja mahdollinen kovalenttisesti sitoutunut kompleksin) erotettiin sitoutumattomasta
 20 kompleksista SephadexTM G-25 -geelisuodatuksella. Tämän menettelyn tuloksena oli keskimäärin 5,0 kompleksia/vasta-ainel-(p-aminobentsyyli)dietyylinitriamiinipentaetikkahapon ollessa kyseessä ja keskimäärin 5,4 kompleksia/vasta-
 aine esimerkin 12 mukainen ligandin kohdalla.

Esimerkki XIX

Esimerkin XVIII mukaisten vasta-aine-kompleksikonjugaattien inerttiyden osoittamiseksi käsiteltiin konjugaatit ylimäärällä dietyleenitriamiinipentaetikkahappoa (DTPA) seuraavasti. Puhdistetut vasta-aine-kompleksiyhdistelmät
 30 lisättiin HEPES-puskuriin (N-2-hydroksietyyli-piperatsiini-N'-2-etaanisulfonihappo), jonka pH oli 7,4, ja käsiteltiin sopivalla määrällä 0,1 M DTPA-liuosta (pH 7,4), niin että DTPA:ta oli 1000-kertainen mooliylimäärä vasta-aineeseen liitettyyn kompleksiin nähden.
 35 Tunnin kuluttua otettiin näyte ja vasta-aine-kompleksikonjugaatit erotettiin pienimolekyyllisistä aineista geelisuodatuksella.

datuksella. Tulokset osoittavat, että ABDTPA-järjestelmästä hävisi yli 98 % yttriumista, kun taas järjestelmä, jossa käytettiin esimerkin 12 mukaista ligandia, menetti noin 39 % yttriumista.

5 **Esimerkki XX**

2,6-bis{[(2-{[(2-{[bis(karboksimetyyli)]amino}etyyli)(karboksimetyyli)]aminometyyli}-4-aminofenoliin samariumkompleksin valmistaminen

10 Samariumliuos valmistettiin yhdistelmällä 1 ml:n pullossa radioaktiivista ^{153}Sm :a (100 μl 3×10^{-4} M liuosta 0,1 M vetykloridihapossa, 6×10^{-5} mol) ja "kylmää" $\text{SmCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$:a (4,8 mg, $1,31 \times 10^{-2}$ mol). Tämä liuos lisättiin 2,6-bis{[2-{[bis(karboksimetyyli)]amino}etyyli)(karboksimetyyli)]aminometyyli}-4-(asetamido)fenoliin (3,2 mg, $5,31 \times 10^{-3}$ mol), joka oli valmistettu esimerkin 11 mukaisesti. Sitten pH säädettiin arvoon 7 lisäämällä natriumhydroksidia (40 μl 1,0 M liuosta). Prosentuaalinen kompleksoitumisaste oli määrityksen mukaan 68 % käytettäessä SephadexTM C-25 -menetelmää.

20 Edellä valmistettu kompleksi puhdistettiin anioninvaihtokromatografialla (Q-SepharoseTM, 1,5 x 21 cm, NaCl 0 $\rightarrow$ 1 mol/l, 30 min, 2 ml/min, detektointi aallonpituudella 285 nm). Kompleksia sisältävät fraktiot (kukin 1 ml, yhteensä 6 ml) yhdistettiin ja prosentuaalisen kompleksoitumisasteen määritettiin olevan 95 %.

25 **Esimerkki XXI**

2,6-bis{[(2-{[bis(karboksimetyyli)]amino}etyyli)-(karboksimetyyli)]aminometyyli}-4-aminofenolin samariumkompleksin kytkeminen monoklonaaliseen vastaaineeseen CC-46

30 Laitettiin natriumkarbonaattia (60 mg, $7,14 \times 10^{-1}$ mmol) 3,7 ml:n lasipulloon ja lisättiin esimerkin XX mukaista kompleksiliuosta (1 ml, noin $8,8 \times 10^{-4}$ mmol). Lisättiin tiofosgeenin (10 μl , $1,31 \times 10^{-1}$ mmol) liuosta kloroformissa (1 ml) ja suljettiin pullo. Seosta ravisteltiin

15 min, minkä jälkeen vesikerros pestiin kahdesti kloroformilla (1 ml:n annoksella). Mitattiin prosentuaalinen kompleksoitumisaste ja todettiin sen olevan 96 %.

5 Edellä mainittu isotiosyanaatti-Sm-kompleksi (100 µl, noin $8,8 \times 10^{-5}$ mmol) yhdistettiin monoklonaaliseen vasta-aineeseen CC-46 (100 µl liuosta, jossa pitoisuus 8 mg/ml, noin $5,3 \times 10^{-6}$ mmol) ja annettiin seistä 24 tuntia. Vasta-aineeseen kytkeytyneen kompleksin määrä oli 46 % kokoeksluusiokromatografisesti määritettynä.

10 Esimerkki XXII

2-[bis(2-[[bis(karboksimetyyli)]amino]etyyli)amino]-2-[5-amino-2-(karboksimetyloksi)fenyyli]etaanihapon ja 2-[[2-[2-[[bis(karboksimetyyli)]amino]etyyli)karboksimetyyli]amino]etyyli}(karboksimetyyli)amino]-2-[5-amino-2-(karboksimetyloksi)fenyyli]etaanihapon samariumkompleksin valmistus

15

Valmistettiin esimerkin 7 mukaisten ligandien liuos liuottamalla 266 mg kylmäkuivattua kiinteää ainetta veteen (1 ml). 33,85 µl tätä liuosta käsiteltiin liuoksella (1 ml), joka sisälsi 3×10^{-4} mol/l $\text{SmCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ja merkkiainemäärän radioaktiivista ^{153}Sm :a. Kompleksiliuoksen pH säädettiin suunnilleen arvoon 13 käyttämällä 50-painoprosenttista natriumhydroksidiliuosta ja sitten suunnilleen arvoon 7,5 käyttämällä 1,0 N vetykloridihappoa. Sm:a prosentuaalinen kompleksoitumisaste määritettiin esimerkissä 16 - 33 kuvatulla tavalla ja sen todettiin olevan 100 %.

20

25

Kompleksin inerttisyys osoitettiin laittamalla kaksi annosta kompleksiliuosta (500 µl) eri pulloihin. Toinen annos käsiteltiin 1 - 2 µl:n annoksilla 0,1 N vetykloridihappoa, kunnes pH laski, ja toinen annos käsiteltiin 0,1 N natriumhydroksidilla pH:n nostamiseksi. Kompleksien annettiin seistä 5 - 10 min kunkin pH-muutoksen yhteydessä ja otettiin sitten niistä näytteet prosen-

30

35

tuaalisen kompleksoitumisasteen määrittämiseksi kyseisen pH-arvon vallitsessa esimerkkien 16 - 33 mukaisella menetelmällä. Tulokset esitetään seuraavassa taulukossa.

5

TAULUKKO V

10

15

20

25

30

35

pH	Kompleksoitumisaste (%)
1	98
2	100
3	100
4	100
5	100
7	100
9	100
11	100
13	100

Esimerkki XXIII

2-[(2-[(2-[[bis(karboksimetyyli)]amino]etyyli)(karboksimetyyli)amino]etyyli)(karboksimetyyli)amino]-2-[2-amino-2-(karboksimetyloksi)fenyyli]etaanihapon samariumkompleksin valmistus

Valmistettiin esimerkin 8 mukaisen ligandin liuos liuottamalla 13,9 mg ruskeahkoa kiinteää ainetta veteen (772 µl). Kompleksi valmistettiin liuottamalla 500 µl tätä ligandiliuosta liuokseen (1 ml), joka sisälsi 3×10^{-4} mol/l SmCl_3 :a (sisälsi 0,1 N vetykloridihappoa) ja pienen määrän radioatiivista ^{153}Sm :a. Kompleksiliuoksen pH säädettiin suunnilleen arvoon 7 lisäämällä 1,0 N natriumhydroksidia. Prosentuaalinen kompleksoitumisaste määritettiin esimerkkien 16 - 33 mukaisella menetelmällä ja sen todettiin olevan 96 %.

Kompleksin inerttiys osoitettiin laittamalla kaksi annosta (500 µl) kompleksiliuosta erillisiin pulloihin. Toinen annos käsiteltiin 1 - 2 µl:n annoksilla 1,0 N vetykloridihappoa, kunnes pH laski ja toinen 0,1 N, 1,0 N ja 50-painoprosenttisella natriumhydroksidilla pH:n nostamiseksi. Kompleksin annettiin seistä noin 5 min kunkin pH-muutoksen yhteydessä ja otettiin niistä sitten näytteet prosentuaalisen kompleksoitumisasteen määrittämiseksi esimerkkien 16 - 33 mukaisesti. Tulokset esitetään seuraavassa taulukossa.

TAULUKKO VI

15	pH	Kompleksoitumisaste (%)
	1	91
	2	88
	3	92
20	5	96
	7	96
	9	99
	12	98
25	13	99

Biologiseen jakautumiseen liittyvät esimerkit

Valmistettiin komplekseja sekoittamalla ligandiliuos ja metalli ja säätämällä pH sitten arvoon 7 - 8. Ligandin kanssa kompleksoituneen metallin määrä määritettiin kationinvaihtokromatografisesti. Vapaa metalli jäi hartsiin, kompleksin muodossa oleva ei.

100 µl komplekseja injektointiin kolmen Sprague-Dawley-rotan häntälaskimoon. Kahden tunnin kuluttua injektoinnista rotat lopetettiin taittamalla niska ja otettiin

kudosnäytteitä. Näytteet punnittiin ja määritettiin säteilymäärä kussakin kudoksessa mittaamalla pulssimäärä käyttämällä NaI-laskuria ja vertaamalla tuloksia standardeihin. Veressä oleva osuus (%) annoksesta määritettiin olettamalla, että veren paino oli 6,5 % eläimen pianosta. Lihaksen osuudeksi laskettiin 46 % eläimen painosta. Lihaksen osuudeksi laskettiin 46 % eläimen painosta. Luussa oleva määrä oli 25-kertainen reidessä olevaan prosenttiosuuteen annoksesta. Seuraavat esimerkit eroavat toisistaan ligandin, ligandimäärän ja käytetyn metallimäärän suhteen. Ei-radioaktiivista metallia käytettiin haluttujen ligandi-metallisuhteiden aikaansaamiseksi ja hivenainemäärää radioaktiivista metallia biologisen jakautumisen määrittämiseksi.

15 **Esimerkki XXIV**

Esimerkin 10 mukaista ligandia sekoitettiin ^{153}Sm -liuoksen kanssa. Sm-pitoisuus oli $3 - 10^{-4}$ mol/l ja ligandia käytettiin 300 - kertainen mooliylimäärä. Biologinen jakautuma oli seuraava; 52,7 % luussa, 0,12 % maksassa, 0,005 % pernassa, 0,23 % lihaksessa ja 0,5 % veressä.

20 **Esimerkki XXV**

Esimerkin 10 mukainen ligandi kompleksoitiin ^{166}Ho :n kanssa. Ho-pitoisuus oli 3×10^{-4} mol/l, ja formula sisälsi 300-kertaisen mooliylimäärän ligandia. Biologinen oli seuraava: 52,9 % luussa, 0,26 % maksassa, 0,007 % pernassa, 1,1 % lihaksessa ja 0,09 % veressä.

25 **Esimerkki XXVI**

Esimerkin 10 mukainen ligandi kompleksoitiin ^{153}Sm :n kanssa käyttämällä Sm-pitoisuutta 3×10^{-4} mol/l ja 10-kertaista mooliylimäärää ligandia. Biologinen jakautuma oli seuraava: 48,5 % luussa, 1,3 % maksassa, 0,01 % pernassa, 0,73 % lihaksessa ja 0,18 % veressä.

30 **Esimerkki XXVII**

Kaniiniin injektointiin samalla tavalla kuin rottiin
35 formulaa, joka sisälsi ^{90}Y :tä ja jonka Y-pitoisuus oli $3 \times$

10⁻⁴ mol/l ja joka sisälsi esimerkin 10 mukaista ligandia 10-kertaisen mooliylimäärän. Aktiivisuuden havaittiin keskittyvän luuhun (59 %); vastaanotto maksaan (1,1 %), pernaan (0,19 %), lihakseen (1,5) ja vereen (0,68 %) oli hyvin vähäistä.

Esimerkki XXVIII

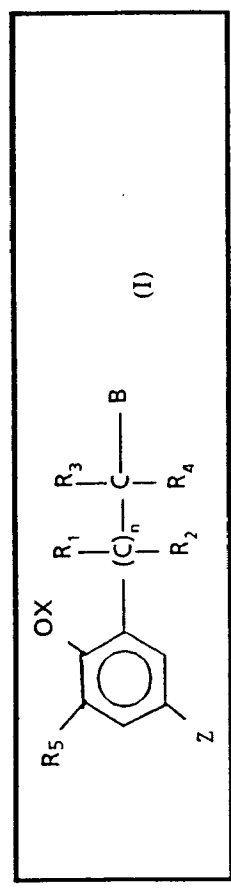
Esimerkin 1 mukainen ligandi kompleksoitiin käyttämällä ⁹⁰Y:ä merkkiaineena. Y-pitoisuus oli 3 x 10⁻⁴ mol/l ja ligandia lisättiin 10-kertainen mooliylimäärä. Biologinen jakautuminen rotassa (kahden rotan keskiarvo) oli 56,1 % luussa, 0,87 % maksassa, 0,03 % pernassa, 0,78 % lihaksessa ja 0,67 % veressä.

Esimerkki XXIX

Koiralla oli osteosakroona oikeassa olkaluussa ja se ontui selvästi. Valmistettiin kompleksi käyttämällä esimerkin 10 mukaista ligandia ja ¹⁵³Sm-liuosta. Sm-pitoisuus oli 3 x 10⁻⁴ mol/l ja ligandia käytettiin 300-kertainen mooliylimäärä. ¹⁵³Sm:n ominaisaktiivisuus oli 30 mCi/ml. Koiralle annettiin laskimonsisäisenä injektiona tätä kompleksia, joka sisälsi 0,95 mCi ¹⁵³Sm:a/painokilo. Koiran käynti oli parantunut huomattavasti viikon kuluttua injektoinnista.

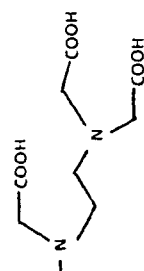
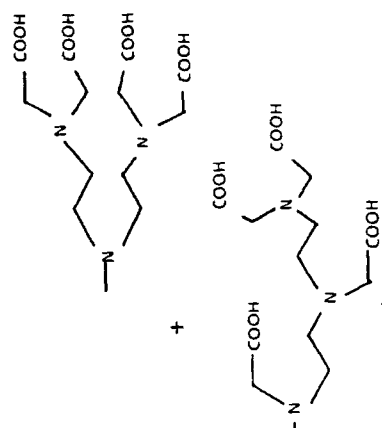
0012000 0001011

TAULUKKO 1
Yleisrakenne

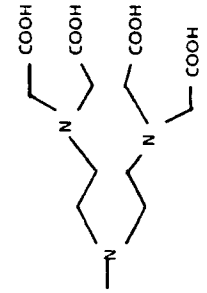
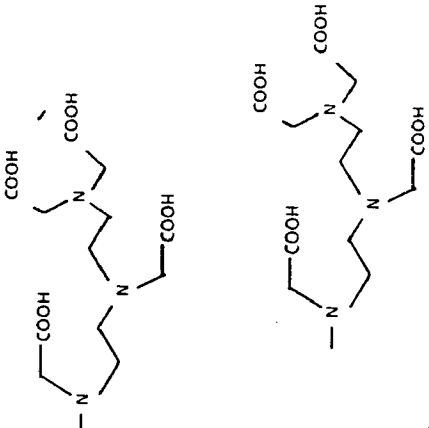


Esim. nro	Z	X	R ₅	n	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	B
1	-NHCOCH ₃	-H	-H	0	-	-	-H	-COOH	
2	-NHCOCH ₃	CH ₂ COOH	-H	0	-	-	-H	-COOH	
3	-NH ₂	CH ₂ COOH	-H	0	-	-	-H	-COOH	
4	-NHCOCH ₃	-H	-H	0	-	-	-H	-COOH	

TAULUKKO 1 (jatkuu)
Yleisrakenne

Esim. nro	Z	X	R ₅	n	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	B
5	-NH ₂	-H	H	0	-	-	-H	-COOH	
6	-NHCOCH ₃	CH ₂ CO ₂ H	H	0	-	-	-H	-COOH	

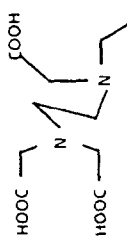
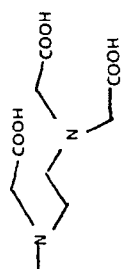
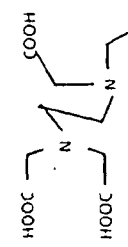
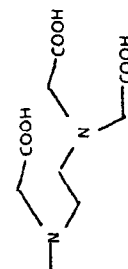
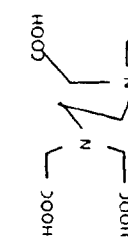
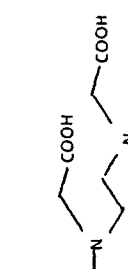
TAULUKKO 1 (jatkuu)
Yleisrakenne

Esim. nro	Z	X	R ₅	n	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	B
7	-NH ₂	CH ₂ COOH	H	0	-	-	-H	-COOH	
8	-NH ₂	CH ₂ COOH	H	0	-	-	-H	-COOH	

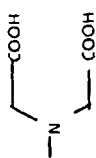
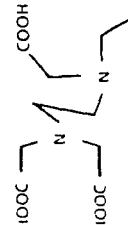
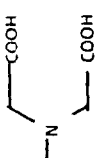
TAULUKKO 1 (jatkuu)
Yleisrakenne

Esim. nro	Z	X	R ₅	n	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	B
9	NHCOCH ₃	CH ₂ CO ₂ H	-H	0	-	-	-H	-COOH	
10	NHCOCH ₃	-H		0	-	-	-H	-COOH	

TAULUKKO 1 (jatkuu)
Yleisrakenne

Esim. nro	Z	X	R ₅	n	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	B
11	NHCOCH ₃	-H		0	-	-	-H	-H	
12	-NH ₂	-H		0	-	-	-H	-H	
13	NCS	-H		0	-	-	-H	-H	

TAULUKKO 1 (jatkuu)
Yleisrakenne

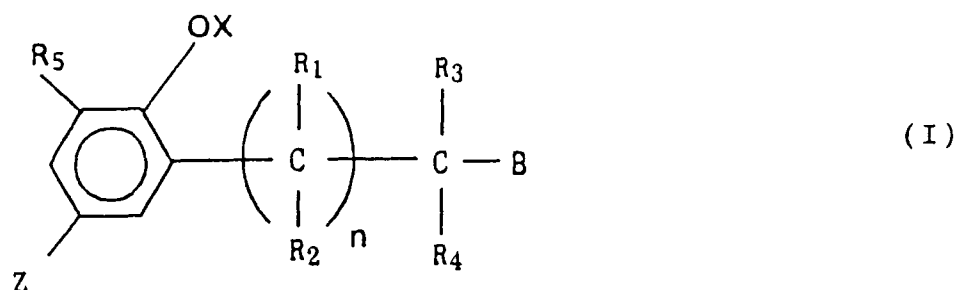
Esim. nro	Z	X	R ₅	n	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	B
14	-NHCOCH ₃	-H	-H	0	-	-	-H	-H	
15	-NHCOCH ₃	-H		0	-	-	-H	-H	

Patenttivaatimukset

1. Ortofunktionaalisesti ligeeraava bifunktionaalinen kelaatinmuodostaja, jolla on kaava I

5

10



jossa

15 Z on -NH₂, -NCS tai -NHCOCH₃;

X on vetyatomi tai ryhmä CR₃R₄COOH;

B on suoraketjuinen tai haaroittunut C₄-C₁₆-polyalkyleeni-N₂-N₄-polyamiiniryhmä, jossa vähintään yksi amiinivedyistä on korvautunut ryhmällä CR₃R₄COOH;

20 kukin ryhmistä R₁, R₂, R₃ ja R₄ on riippumattomasti vetyatomi tai ryhmä CO₂H;

R₅ on vetyatomi tai ryhmä (CR₁R₂)_nCR₃R₄B'; jossa

B' on suoraketjuinen tai haaroittunut amiini- tai C₄-C₁₆-polyalkyleeni-N₂-N₄-polyamiiniryhmä jossa vähintään yksi amiinivedyistä on korvautunut ryhmällä CR₃R₄COOH; ja

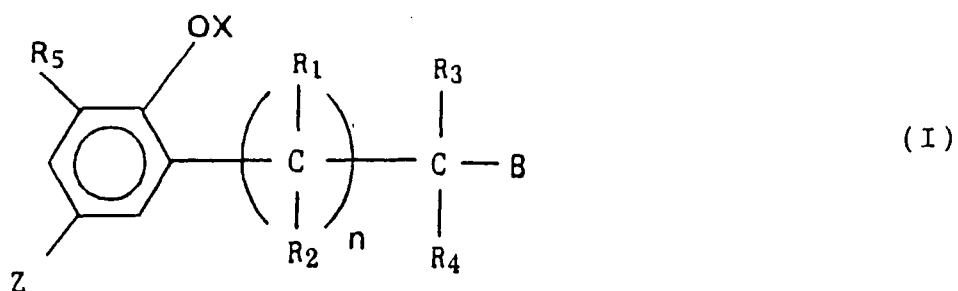
25 n on 0 tai 1; tai

sen farmaseuttisesti hyväksyttävä suola.

2. Menetelmä ortofunktionaalisesti ligeeraavan bifunktionaalisen kelaatinmuodostajan valmistamiseksi, jolla on kaava I

30

35



jossa

Z on $-\text{NH}_2$, $-\text{NCS}$ tai $-\text{NHCOCH}_3$;

X on vetyatomi tai ryhmä $\text{CR}_3\text{R}_4\text{COOH}$;

5 B on suoraketjuinen tai haaroittunut C_4 - C_{16} -polyalkyleeni- N_2 - N_4 -polyamiiniryhmä, jossa vähintään yksi amiinivedyistä on korvautunut ryhmällä $\text{CR}_3\text{R}_4\text{COOH}$;

kukin ryhmistä R_1 , R_2 , R_3 ja R_4 on riippumattomasti vetyatomi tai ryhmä CO_2H ;

10 R_5 on vetyatomi tai ryhmä $(\text{CR}_1\text{R}_2)_n\text{CR}_3\text{R}_4\text{B}'$, jossa

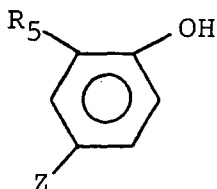
B' on suoraketjuinen tai haaroittunut amiini- tai C_4 - C_{16} -polyalkyleeni- N_2 - N_4 -polyamiiniryhmä, jossa vähintään yksi amiinivedyistä on korvautunut ryhmällä $\text{CR}_3\text{R}_4\text{COOH}$; ja

n on 0 tai 1; tai

15 sen farmaseuttisesti hyväksyttävän suolan valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että

A) saatetaan yhdiste, jolla on kaava

20



jossa Z ja R_5 merkitsevät samaa kuin edellä,

25 tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävä suola reagoimaan yhdisteen B ja aldehydin tai vastaavan aldehydiesiasteen kanssa, jolloin B on suoraketjuinen tai haaroittunut amiini tai polyalkyleeni-amiini, jossa on vähintään yksi amiinivety, emäksen ja sopivan liuottimen läsnä ollessa korkeintaan lämpötilassa $20\text{ }^\circ\text{C}$, minkä jälkeen seosta kuumentetaan ja erotetaan haluttu tuote, jolla on kaava I;

30 B) saatetaan vaiheessa A valmistettu tuote reagoimaan halogeeni- $(\text{CR}_1\text{R}_2)_n\text{CR}_3\text{R}_4$ -hapon kanssa pH-arvon ollessa vähintään 9 emäksen läsnäollessa korkeintaan lämpötilassa $20\text{ }^\circ\text{C}$, jolloin saadaan kaavan I mukaisia yhdisteitä, joissa vähintään yksi ryhmistä R_1 , R_2 , R_3 ja R_4 on CO_2H ;

35

C) hydrolysoidaan vaiheessa B saatu tuote, jossa Z on HC(O)CH_3 , NaOH:n vesiliuoksella, jolloin saadaan kaavan I mukaisia tuotteita, joissa Z on NH_2 ;

5 D) saatetaan vaiheessa A saatu tuote reagoimaan glykolinitriilin kanssa emäksen läsnä ollessa pH:n ollessa vähintään 9 korkeintaan lämpötilassa 20°C ja hydrolysoidaan sitten syaaniryhmä HCl:n vesiliuoksella, jolloin saadaan kaavan I mukaisia tuotteita, joissa vähintään yksi ryhmistä R_1 , R_2 , R_3 ja R_4 on CO_2H ;

10 E) hydrolysoidaan vaiheessa A saatu tuote, jossa Z on NHC(O)CH_3 , DCl:n D_2O -liuoksella kuumentuen, jolloin saadaan kaavan I mukaisia tuotteita, joissa Z on NH_2 ; ja

15 F) saatetaan missä tahansa vaiheessa A - E valmistettu tuote, jossa Z on NH_2 , reagoimaan tiofosgeenin kanssa, jolloin saadaan kaavan I mukaisia tuotteita, joissa Z on isotiosyanaattiryhmä.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että n on 0 ja/tai R_4 on CO_2H ja/tai X on vety ja/tai kukin ryhmistä R_1 , R_2 , ja R_3 on vetyatomit.

20 4. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että Z on amiini-, isotiosyanaatti- tai maleimidiryhmä ja/tai emäs on natriumhydroksidi.

5. Patenttivaatimuksen 2 vaiheen (A) mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että

25 valmistetaan 2-[(2-{[bis(karboksimetyyli)]amino}etyyli)-amino]-2-(5-asetamido-2-hydroksifenyyli)etaanihappoasaattamalla 4-asetamidofenoli ja glyoksyylihappo reagoimaan epäsymmetrisen etyleenidiamiinidietikkahapon kanssa;

30 valmistetaan 2-[bis(2-{[(bis(karboksimetyyli)]amino}etyyli)amino)-2-[5-asetamido-2-(karboksimetyloksi)fenyyli]-etaanihappo saattamalla 4-asetamidofenoli ja glyoksyylihappo reagoimaan dietyleenitriamiinin kanssa;

35 valmistetaan 2-[[2-[(2-{[bis(karboksimetyyli)]amino}etyyli)(karboksimetyyli)-amino]etyyli](karboksimetyyli)amino]-2-[5-asetamido-2-(karboksimetyloksi)fenyyli]etaanihappo

- saattamalla 4-asetamidofenoli ja glyoksyylihapo reagoimaan dietyleenitriamiinin kanssa;
valmistetaan 2-[[2-[(2-[[bis(karboksimetyyli)]amino]etyyli)(karboksimetyyli)amino]etyyli](karboksimetyyli)amino]-
- 5 2-[5-amino-2-(karboksimetyloksi)fenyyli]etaanihappoa saattamalla dietyleenitriamiinietikkahappo ja 4-asetamidofenoli reagoimaan glyoksyylihapon kanssa;
valmistetaan 2-[2-[(2-[[bis(karboksimetyyli)]amino]etyyli)(karboksimetyyli)amino]etyyli](karboksimetyyli)amino]-
- 10 amino]etyyli)(karboksimetyyli)amino]-2-[5-asetamido-2-(karboksimetyloksi)fenyyli]etaanihappoa saattamalla 4-asetamidofenoli ja glyoksyylihapo reagoimaan suoraketjuisen trietyleenitetramiinin kanssa;
valmistetaan 2-[(2-[2-[[bis(karboksimetyyli)]amino]etyyli)(karboksimetyyli)amino]etyyli)(2-[[bis(karboksimetyyli)]amino]etyyli)amino]-2-[5-asetamido-2-(karboksimetyloksi)fenyyli]etaanihappoa saattamalla 4-asetamidofenoli ja glyoksyylihapo reagoimaan suoraketjuisen trietyleenitetramiinin kanssa;
- 15 valmistetaan 2,6-bis{[(bis(karboksimetyyli)amino)(karboksimetyyli)]-4-asetamido)fenolia saattamalla 4-asetamidofenoli ja iminodietikkahappo reagoimaan glyoksyylihapon kanssa;
- 20 valmistetaan 2,6-bis{[(bis(karboksimetyyli)amino)(karboksimetyyli)]-4-asetamido)fenolia saattamalla 4-asetamidofenolia saattamalla trinatriumetyleenidiamiinitrietikkahappo ja formaldehydin vesiliuos reagoimaan 4-asetamidofenolin kanssa;
- 25 valmistetaan 2,6-bis{[2-[(bis(karboksimetyyli)]amino]etyyli)(karboksimetyyli)]-aminometyyli]-4-(asetamido)fenolia saattamalla trinatriumetyleenidiamiinitrietikkahappo ja formaldehydin vesiliuos reagoimaan 4-asetamidofenolin kanssa;
- 30 valmistetaan 2-([bis(karboksimetyyli)]amino)metyyli)-6-[[([bis(karboksimetyyli)]amino)etyyli)(karboksimetyyli)]-amino]metyyli]-4-(asetamido)fenoli saattamalla iminodietikkahappo ja formaldehydi reagoimaan 4-asetamidofenolin kanssa;
- 35 valmistetaan 2-([bis(karboksimetyyli)]amino)metyyli)-6-[[([bis(karboksimetyyli)]amino)etyyli)(karboksimetyyli)]-

amino}metyyli}-4-(asetamido)fenolia saattamalla etyleeni-
diamiinitrietikkahappo ja formaldehydi reagoimaan 2-
([bis(karboksimetyyli)]amino}metyyli)-4-(asetamido)fenoli-
nin kanssa.

5 6. Patenttivaatimuksen 2 vaiheen (B) mukainen mene-
elmä, t u n n e t t u siitä, että valmistetaan 2-[(2-
{[bis(karboksimetyyli)]amino}etyyli)(karboksimetyyli)-
amino]-2-[5-asetamido-2-(karboksimetyloksi)fenyyli]etaa-
nihappoa saattamalla 2-[(2-{[bis(karboksimetyyli)]amino}-
10 etyyli)amino]-2-(5-asetamido-2-hydroksifenyyli)etaanihappo
reagoimaan bromietikkahapon kanssa.

7. Patenttivaatimuksen 2 vaiheen (C) mukainen mene-
telmä, t u n n e t t u siitä, että valmistetaan 2-[(2-
{[bis(karboksimetyyli)]amino}etyyli)(karboksimetyyli)-
15 amino]-2-[5-amino-2-(karboksimetyloksi)fenyyli]etaanihap-
poa saattamalla 2-[2-{[bis(karboksimetyyli)]amino}etyy-
li)(karboksimetyyli)-amino]-2-[5-asetamido-2-(karboksi-
metyloksi)fenyyli]etaanihappo reagoimaan NaOH:n kanssa
H₂O:ssa.

20 8. Patenttivaatimuksen 2 vaiheen (D) mukainen mene-
telmä, t u n n e t t u siitä, että valmistetaan 2-[(2-
{[bis(karboksimetyyli)]amino}etyyli)(karboksimetyyli)-
amino]-2-(5-amino-2-hydroksifenyyli)etaanihappoa saatta-
malla 2-[2-((bis(karboksimetyyli)]amino}etyyli)amino]-2-
25 (5-asetamido-2-hydroksifenyyli)etaanihappo reagoimaan
glykolinitriilin ja NaOH:n kanssa, jolloin muodostuu 2-
[(2-{[bis(karboksimetyyli)]amino}etyyli)(syanometyyli)-
amino]-2-(5-asetamido-2-hydroksifenyyli)etaanihappoa, mitä
seuraa hydrolysointi HCl:lla H₂O:ssa.

30 9. Patenttivaatimuksen 2 vaiheen (E) mukainen mene-
telmä, t u n n e t t u siitä, että valmistetaan 2-[bis-
(2-[[bis(karboksimetyyli)]amino}etyyli)amino]-2-[5-amino-
2-(karboksimetyloksi)fenyyli]etaanihappoa saattamalla 2-
[bis(2-[[bis(karboksimetyyli)]amino}etyyli)amino]-2-[5-
35 asetamido-2-(karboksimetyloksi)fenyyli]etaanihappo rea-
goimaan DCl:n kanssa D₂O:ssa;

valmistetaan 2-[[2-[(2-[[bis(karboksimetyyli)]amino}etyyli)(karboksimetyyli)-amino]etyyli](karboksimetyyli)amino]-2-[5-amino-2-(karboksimetyloksi)fenyyli]etaanihappoa saattamalla 2-[[2-[2-[[bis(karboksimetyyli)]amino}etyyli)-
 5 (karboksimetyyli)amino]etyyli](karboksimetyyli)amino]-2-[5-asetamido-2-(karboksimetyloksi)fenyyli]etaanihappo reagoimaan DCl:n kanssa D₂O:ssa; tai valmistetaan 2,6-bis{[(2-[[bis(karboksimetyyli)]amino}-etyyli)(karboksimetyyli)]-aminometyyli-4-aminofenolia
 10 saattamalla 2,6-bis{[(2-[[bis(karboksimetyyli)]amino}-etyyli)(karboksimetyyli)]-aminometyyli}-4-(asetamido)fenoli reagoimaan DCl:n kanssa D₂O:ssa.

10. Patenttivaatimuksen 2 vaiheen (F) mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että valmistetaan 2,6-bis{[(2-[[bis(karboksimetyyli)]amino}etyyli)(karboksimetyyli)]-aminometyyli}-4-(isotiosyanaatti)fenolia saattamalla 2,6-bis{[(2-[[bis(karboksimetyyli)]amino}etyyli)(karboksimetyyli)]-aminometyyli}-4-aminofenoli reagoimaan
 15 tiofosgeenin kanssa.

TUTKIMUSRAPORTTI

PATENTTIHAK.NRO 895/41	LUOKKA C07C 233/54	TUTKIJA EY	TUTKIMUSTUL. SAATU <table border="1" style="width: 100%; height: 40px; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 12.5%;"></td> <td style="width: 12.5%;"></td> <td style="width: 12.5%;"></td> <td style="width: 12.5%;"></td> <td style="width: 12.5%;"></td> <td style="width: 12.5%;"></td> <td style="width: 12.5%;"></td> <td style="width: 12.5%;"></td> </tr> </table>								
TUTKITUT LUOKAT	TUTKITUT MAAT FI SE NO DK CH DE WO EP GB US		TUTK. KESK. *)								
PATENTTIVIRASTOJEN JULKAISUT	LUOKKA	HUOM!									
1) US-A 2763680	260-507										
2) US-A 3312552	96-94										
3) US-A 4046793	C07F 15/02										
4) FR-A 2238699	C07C 101/30										
5) EP-A3 68875	C07C 101/12										
6) WO-A1 88/01618	C07C 161/02										
7) EP-A3 230893	C07C 101/26										
8) WO-A1 84/03698	C07C 161/04										
9) CH-C 353747	129, 14/04										
*) TUTKIMUS KESKEYTETTY ESTEEN LÖYTÄMISEN TAKIA KÄÄNNÄ!											

PATENTTIVIRASTOJEN JULKAISUT	LUOKKA	HUOM!
10)		
11)		
12)		
13)		
14)		
15)		
16)		
17)		
18)		
19)		

MUITA JULKAISUJA / ON-LINE TUTKIMUS, JOS TEHTY (TIETOKANTA,
HAKUSANAT YM.)

Chemical Abstracts, vol. 86 (1977) 139627d.

HELSINKI

29.8.-94

PÄIVÄYS

Eira Ylilommi

ALLEKIRJOITUS