



(19) REPUBLIKA HRVATSKA
DRŽAVNI ZAVOD ZA
INTELEKTUALNO VLASNIŠTVO

(10) Identifikator
dokumenta:



HR P20050584 A2

HR P20050584 A2

(12) PRIJAVA PATENTA

(51) MKP:

A61K 38/10 (2006.01)
A61K 38/08 (2006.01)
C07K 7/08 (2006.01)

C07K 7/06 (2006.01)

(21) Broj prijave u HR:

P20050584A

(22) Datum podnošenja prijave patenta u HR:

21.06.2005.

(43) Datum objave prijave patenta u HR:

30.04.2006.

(86) Broj međunarodne prijave:

PCT/US03/037895

Datum podnošenja međunarodne prijave

25.11.2003.

(87) Broj međunarodne objave:

WO 04/063213

Datum međunarodne objave

29.07.2004.

(31) Broj prve prijave: 60/429,174
60/475,539

(32) Datum podnošenja prve prijave: 25.11.2002.
02.06.2003.

(33) Država ili organizacija podnošenja prve prijave: US
US

(71) Podnositelj prijave:

Attenuon, LLC., 11535 Sorrento Valley Road, Suite 401, San Diego, 92121 CA, US

(72) Izumitelji:

Amy, L. Allan, 542 San Dieguito Drive, Encinitas, 92024 CA, US
Won, Hyung Yoon, 11187 Camino Ruiz# 75, San Diego, 92126 CA, US
Patricia, L. Gladstone, 9242 Pebbelstone Lane, San Diego, 92126 CA, US
Robert J. Ternansky, 4125 Shorepoint Way, San Diego, 92130 CA, US
Graham Parry, 2954 Renault Place, San Diego, 92122 CA, US
Fernando Donate, 10744 Portobelo Drive, San Diego, 92124 CA, US
Andrew Mazar, 10816 Vereda Sol Del Dios, San Diego, 92130 CA, US

(74) Punomoćnik:

Dragutin Sikirić, Zagreb, HR

(54) Naziv izuma:

PEPTIDI KOJI SU USMJERENI NA TUMOR I ENDOTELNE STANICE, MJEŠAVINE I NJIHOVE
UPOTREBE

(57) Sažetak: Ovaj se izum općenito odnosi na peptidne analoge spoja Ac-PHSCN-NH₂, a koji su usmjereni na tumorske i endotelne stanice, te imaju protutumorsko, antiangiogenično i antimetastatsko djelovanje, zatim na metode izrade tih peptida, njihove mješavine i metode korištenja tih peptida i njihovih farmaceutskih mješavina, za tretiranje, sprječavanje i dokazivanje bolesti karakteriziranih tumorskim rastom, metastazama i angiogenezom. Peptidni analozi mogu služiti, među ostalim, kao prijenosnici radioaktivnosti, PET-aktivnih spojeva, toksina, fluorescentnih molekula i PEG molekula.

HR P20050584 A2

OPIS IZUMA

Polje izuma

Ovaj izum se odnosi općenito na peptidne analoge spoja Ac-PHSCN-NH₂ koji su usmjereni na tumor i endotelne stanice te imaju protutumorsko, antiangiogenično i antimetastatsko djelovanje, zatim na metode izrade tih peptida, njihove mješavine i metode upotrebe tih peptida i njihovih farmaceutskih mješavina za tretiranje, sprječavanje i određivanje oboljenja karakteriziranih rastom tumora, metastazama i angienezom. Peptidni analozi mogu služiti, između ostalog, kao prijenosnici radioaktivnosti, PET-aktivnih spojeva, toksina, fluorescentnih molekula i PEG molekula.

Pozadina izuma

Integrini su heterodimerni, transmembranski proteini koji su uključeni u adheziju stanice, pokretnost i preživljavanje (Geiger *et al.*, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* **2001**, 2 (11): 793- 805). Ligandi integrina tvore vanstanični matriks (ECM) i osnovne membrane te uključuju kolagen, laminin, fibronektin, vitronektin, i fibrinogen (Bokel, *Dev. Cell* **2002**, 3 (3): 311-21; Stupack *et al.*, *J Cell Sci* **2002**, 115 : 3729-38; Bornstein *et al.*, *Curr Opin Cell Biol* **2002**, 14 (5): 608-16). Ekspresija integrina te, što je važno, stanje aktivacije integrina je izmijenjeno kod tumorskog tkiva (Liu *et al.*, *Semin Oncol* **2002**, 29 (3 Suppl 11): 96-103; Hood *et al.*, *Nat. Rev. Cancer* **2002** 2 (2): 91-100; Felding-Habermaim, *Clin Exp Metastasis* **2003**, 20 (3): 203-13). U skladu s time je nekoliko integrina, uključujući $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ i $\alpha_5\beta_1$, bilo prepoznato kao vrijedne terapijske mete za tretiranje i sprječavanje raka (Kumar, *Curr Drug Targets* **2003**, 4 (2):123-31; Kerr *et al.*, *Expert Opin Investig Drugs* **2002**, 11 (12): 1765-74; Rust *et al.*, *J Biomed Biotechnol.* **2002**, 2 (3): 124-130; Damiano, *Curr Cancer Drug Targets* **2002**, 2(1):37-43; Tucker, *Curr Opin Pharmacol* **2002**, 2 (4): 394-402) i na receptor usmjerene metode prikaza ("imaging") za onkologiju (Herschman, *Science* **2003**, 302 (5645): 605-8); Aboagye *et al.*, *Invest New Drugs* **2003**, 21 (2):169-81; Van De Wiele *et al.*, *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **2002** 29 (5): 699-709; Glaser *et al.*, *Int J Oncol* **2003**, 22 (2): 253-67).

Integrin $\alpha_5\beta_1$ se normalno ne ispoljava kod mirujućih endotelnih stanica, ali se njegovo ispoljavanje potiče za vrijeme angiogeneze (Kim *et al.*, *Am J Pathol* **2000**, 156 (4): 1345-62). Integrin $\alpha_5\beta_1$ predstavlja receptor za fibronektin, protein koji je obilan u plazmi, a koji može također biti povezan s vanstaničnim matriksom (Labat-Robert, *Semin Cancer Biol* **2002**, 12 (3): 187-95). Fibronektin međudjeluje s $\alpha_5\beta_1$ integrinom preko nekoliko epitopa uz to da je glavno adhezivno međudjelovanje posredovano pomoću RGD sekvence unutar desetog ponavljanja tipa III. Glavno adhezivno međudjelovanje posreduje staničnim signalnim događajima te se može pojačati pomoću drugog epitopa smještenog u devetom ponavljanju tipa III, a koje se naziva regija sinergije (drugim riječima, PHSRN) (Akiyama *et al.*, *Cancer Metastasis Rev* **1995**, 14 (3): 173-89). Antagonisti $\alpha_5\beta_1$ integrina su bili sposobni inhibirati tumorsku angiogenezu i uzrokovati povlačenje tumora što pokazuje terapijski potencijal terapije usmjerene na integrin $\alpha_5\beta_1$ (Kim *et al.*, navedeno gore). Čini se da je integrin $\alpha_5\beta_1$ također važan za preživljavanje i metastaze tumorskih stanica (O'Brien *et al.*, *Exp Cell Res* **1996**, 224(1) : 208-13; Ruoslahti, *Invasion Metastasis* **1994-95**, 14 (1-6): 87-9724-26); Kemperman *et al.*, *Invasion Metastasis* **1994-95**, 14 (1-6): 98-108; Tani *et al.*, *Br J Cancer* **2003**, 88 (2): 327-33).

Integrin $\alpha_v\beta_3$ predstavlja također terapijsku metu za inhibiranje tumorske angiogeneze, pošto su inhibitori $\alpha_v\beta_3$ (na primjer, monoklonska antitijela, ciklički RGD peptidi i mali nepeptidni organski spojevi) učinkoviti kod višestrukih prekliničkih modela napredovanja raka (Kumar, *Curr Drug Targets* **2003**, 4 (2):123-31; Varner *et al.*, *Important Adv Oncol* **1996**, 69-87; Brooks, *J Clin Invest* **1995**, 96 (4): 1815-22). Premda do ekspresije $\alpha_v\beta_3$ normalno ne dolazi kod epitelnih stanica, ona je pojačana kod tumorskih stanica, što dovodi do adhezije tumorske stanice, migracije i invazije (Metzner *et al.*, *J Invest Dermatol* **1996**, 107 (4): 597- 602). Integrin $\alpha_v\beta_3$ je bio umiješan kod napredovanja melanoma i metastaza (Nip *et al.*, *Cancer Metastasis Rev* **1995**, 14 (3): 241-52), a ekspresija $\alpha_v\beta_3$ integrina je bila zabilježena i dokazana u raznim tipovima tumorskih stanica uključujući stanice tumora grudi, prostate, gušterače, bubrega, te stanice glioma (Felding-Habermann *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* **2001**, 98 (4): 1853-8; Platten *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun* **2000**, 268 (2): 607-11; Lohr *et al.*, *Pancreas* **1996**, 12 (3): 248-59; Rabb *et al.*, *Am J Nephrol* **1996**, 16 (5): 402-8; Cooper *et al.*, *Neoplasia* **2002**, 4 (3): 191-4). Nadalje, ekspresija integrina $\alpha_v\beta_3$ je također bila povezana s metastazom kosti (Pecheur *et al.*, *FASEB J* **2002**, 16 (10): 1266-8.).

Spoj Ac-PHSCN-NH₂ je izveden iz sekvence sinergije fibronektina te je za njega bilo pokazano da je usmjeren na aktivirane $\alpha_5\beta_1$ i $\alpha_v\beta_3$ integrine na staničnim površinama (Livant, United States Patent No. 6,001, 965; Livant, United States Patent No. 6,472, 369; Livant *et al.*, *Cancer Res* **2000**, 60 (2): 309-20). Nadalje, Ac-PHSCN-NH₂ potpuno inhibira invaziju DU145 i metastazu MatLiLu stanica kod modela štakora (Livant *et al.*, navedeno gore) te u kombinaciji s preživljavanjem poboljšanim pomoću 5FU infuzije kod modela CT26 raka debelog crijeva (Stoeltzing *et al.*, 171, *Int J Cancer* **2003**, 104 (4): 496-503). U skladu s time, Ac-PHSCN-NH₂ je usmjeren na tumore i krvne žile koje hrane tumorske stanice kao što je prikazano pomoću vizualizacije Ac-PHSCN-NH₂ derivata.

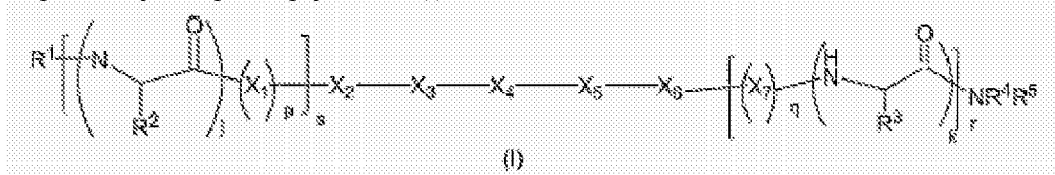
Stoga su potrebni novi peptidni analozi Spoj Ac-PHSCN-NH₂ kako bi se potpuno istražio potencijal Ac-PHSCN-NH₂ derivata u smislu usmjeravanja na tumore i krvožilni sustav koji opskrbljuje hranom tumorske stanice. Idealno, peptidni

analozi će služiti, između ostalog, kao prijenosnici radioaktivnosti za prikaz i radioterapiju, PET-aktivnih spojeva za PET-prikaz, toksina za usmjerenu isporuku staničnih toksina, fluorescentnih molekula za vizualizaciju i PEG molekula za poboljšanje farmakokinetičkih značajka.

5 Sažetak izuma

Ovaj izum zadovoljava te i druge potrebe na taj način da pruža peptidne analoge spoja Ac-PHSCN-NH₂ koji su usmjereni na tumor i endotelne stanice te imaju protutumorsko, antiangiogenično i antimetastatsko djelovanje, zatim metode izrade tih peptida, njihove mješavine i metode korištenja tih peptida i njihovih farmaceutskih mješavina za tretiranje, spriječavanje te određivanje i dokazivanje bolesti karakteriziranih rastom tumora, metastazama i angiogenezom. Peptidni analozi mogu služiti, između ostalog, kao prijenosnici radioaktivnosti, PET aktivnih spojeva, toksina, fluorescentnih molekula i PEG molekula.

U jednom aspektu ovaj izum pruža spoj formule (I) :



ili njihovu farmaceutski prihvatljivu sol, solvat, hidrat ili N-oksid pri čemu:

j i k predstavljaju nezavisno 0 ili 1;

p i q predstavljaju nezavisno cijeli broj između i uključujući 0 i 100;

r i s predstavljaju nezavisno 0 ili 1 ;

R¹ predstavlja acil, supstituirani acil, acil kelat, alkil, supstituirani alkil, cikloalkil, supstituirani cikloalkil, imino ili supstituirani imino;

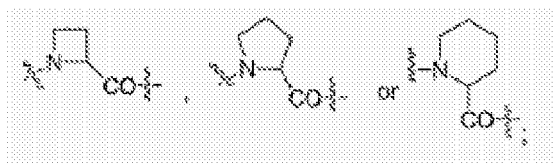
R² predstavlja C₁-C₆ alkil pri čemu je najmanje jedan atom vodika zamijenjen supstutentom odabranim iz grupe koja se sastoji od: -NR⁶R⁷, -OR⁸, -CO₂R⁹, -S(O)₂R¹⁰, -P(OR¹¹)OR¹², aril i supstituirani aril;

R⁶, R⁷, R⁸, R⁹, R¹⁰, R¹¹ i R¹² su nezavisno odabrani iz grupe koja se sastoji od: vodik, acil, supstituirani acil, acil kelat, alkil, supstituirani alkil, cikloalkil, supstituirani cikloalkil, imino i supstituirani imino;

X₁ predstavlja -NH(C=C)_gCO-, -NH(CH₂)_hCO- ili -NHCH(CH₃)CO-;

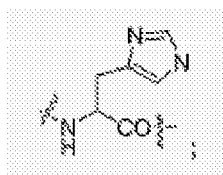
g i h nezavisno predstavljaju 1, 2, 3, 4, 5 ili 6

X₂ predstavlja

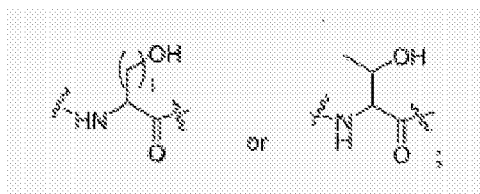


Ključ uz sliku: or = ili

X₃ predstavlja



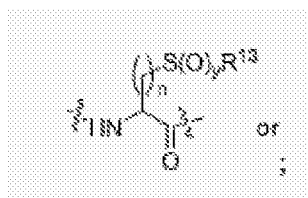
X₄ predstavlja



Ključ uz sliku: or = ili

1 predstavlja cijeli broj od 1 do 4;

X_5 predstavlja



Ključ uz sliku: or = ili

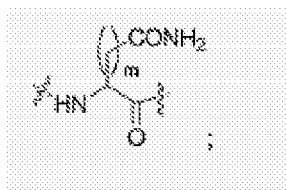
10 R^{13} predstavlja vodik, alkil, supstituirani alkil, acil, supstituirani acil, arilalkil, supstituirani arilalkil, aril, supstituirani aril ili $-S(O)_xR^{14}$;

n predstavlja cijeli broj od 1 do 5;

15 R^{14} predstavlja alkil, supstituirani alkil, acil, supstituirani acil, arilalkil, supstituirani arilalkil, aril ili supstituirani aril;

y i x nezavisno predstavljaju 0, 1 ili 2;

X_6 predstavlja



m predstavlja cijeli broj 1, 2, 3 ili 4;

X_7 predstavlja $-NH(C=C)_dCO-$, $-NH(CH_2)_eCO-$ ili $-NHCH(CH_3)CO-$;

d i e nezavisno predstavljaju 1, 2, 3, 4, 5 ili 6;

R^3 predstavlja C_1-C_6 alkil pri čemu je najmanje jedan atom vodika zamijenjen supstuentom odabranim iz grupe koja se sastoji od: $-NR^{15}R^{16}$, $-OR^{17}$, $-CO_2R^{18}$, $-S(O)_nR^{19}$, $-P(OR^{20})OR^{21}$, aril i supstituirani aril;

R^4 i R^5 nezavisno predstavljaju vodik, alkil ili supstituirani alkil; a

R^{15} , R^{16} , R^{17} , R^{18} , R^{19} , R^{20} i R^{21} su nezavisno odabrani iz grupe koja se sastoji od: vodik, acil, supstituirani acil, acil kelat, alkil, supstituirani alkil, cikloalkil, supstituirani cikloalkil, imino i supstituirani imino;

uz uvjet da R^1 ne predstavlja acetil u slučaju kada R^4 i R^5 predstavljaju vodik, a r i s predstavljaju 0. U drugom aspektu, ovaj izum pruža farmaceutske mješavine spojeva izuma. Farmaceutске mješavine općenito uključuju jedan ili više spojeva izuma ili njihove farmaceutske prihvatljive soli, hidrate ili solvate te farmaceutske prihvatljiv razrjeđivač, nosivu tvar, ekscipijent i pomoćnu tvar. Izbor razrjeđivača, nosive tvari, ekscipijenta i pomoćne tvari će zavisiti od, među ostalim činiocima, željenom načinu davanja.

U trećem aspektu, ovaj izum pruža metode za tretiranje ili sprječavanje bolesti ili poremećaja kao što je rak. Metode općenito uključuju davanje pacijentu kojemu je potreban takav tretman ili sprječavanje, terapijski učinkovite količine spoja izuma i/ili njegove farmaceutske mješavine.

U četvrtom aspektu, ovaj izum pruža metode za određivanje i dokazivanje bolesti ili poremećaja kao što je rak. Metode općenito uključuju davanje pacijentu kojemu je potreban takav tretman ili sprječavanje, dijagnostički učinkovite količine spoja izuma i/ili njegove farmaceutske mješavine.

Detaljan opis izuma**Definicije**

5 Pojam "spojevi izuma" odnosi se na spojeve obuhvaćene strukturnim formulama (I), (II), (III), (IV) i (V) objavljenima ovdje te uključuje bilo koje određene spojeve koji potpadaju unutar te generičke formule čija je struktura objavljena ovdje. Spojevi izuma se mogu identificirati ili pomoću njihove kemijske strukture i/ili kemijskog imena. Kada dolazi do neslaganja između kemijske strukture i kemijskog imena, kemijska struktura postaje odrednica za identitet spoja. Spojevi izuma mogu sadržavati jedan ili više kiralnih centara i/ili dvostrukih veza te stoga mogu postojati kao stereoizomeri, kao što su izomeri s različitim položajem dvostruke veze (drugim riječima, geometrijski izomeri), enantiomeri ili diastereomeri. U skladu s time, kemijske strukture prikazane ovdje uključuju sve moguće enantiomere i stereoizomere ilustriranih spojeva uključujući stereoizomerički čisti oblik (na primjer, geometrijski čisti, enantiomerički čisti ili diastereomerički čisti) te enantiomerne i stereoizomerne mješavine. Spojevi izuma mogu također postojati u nekoliko tautomernih oblika. U skladu s time, kemijske strukture prikazane ovdje obuhvaćaju sve moguće tautomerne oblike ilustriranih spojeva. Spojevi izuma također uključuju izotopima označene spojeve kod kojih jedan ili više atoma imaju atomsku masu različitu od atomske mase koja se konvencionalno nalazi u prirodi. Primjeri izotopa koji mogu biti uključeni u spojeve izuma uključuju, ali na taj način da nisu time ograničeni, ^2H , ^3H , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{17}O , ^{18}O , itd. Spojevi izuma mogu postojati u nesolvatiranim oblicima kao i u solvatiranim oblicima, uključujući hidratirane oblike te kao N-oksidi. Općenito, spojevi u hidratiranom, solvatiranom i N-oksid obliku obuhvaćeni su područjem ovog izuma.

20 Određeni spojevi ovog izuma mogu postojati u višestrukim, kristaliničnim ili amorfnim oblicima. Općenito, svi fizički oblici su ekvivalentni za upotrebe koje se razmatraju ovim izumom te je namjera da budu obuhvaćeni područjem ovog izuma. Nadalje, treba shvatiti da, kada se slikom opisuju djelomične strukture spojeva izuma, zgrade naznačuju točku pričvršćivanja djelomične strukture ostatku molekule.

25 Pojam "alkil" sam po sebi ili kao dio drugog supstituenta, odnosi se na zasićeni ili nezasićeni, razgranati, ravnolančani ili ciklički monovalentni ugljikovodični radikal izveden uklanjanjem jednog atoma vodika s jednog atoma ugljika prvobitnog alkana, alkena ili alkina. Tipične alkil grupe uključuju, ali na taj način da nisu time ograničene, metil; etile kao što su etanil, etenil, etinil; propile kao što su propan-1-il, propan-2-il, ciklopropan-1-il, prop-1-en-1-il, prop-1-en-2-il, prop-2-en-1-il (alil), cikloprop-1-en-1-il; cikloprop-2-en-1-il, prop-1-in-1-il, prop-2-in-1-il, itd.; butile kao što su butan-1-il, butan-2-il, 2-metil-propan-1-il, 2-metil-propan-2-il, ciklobutan-1-il, but-1-en-1-il, but-1-en-2-il, 2-metil-prop-1-en-1-il, but-2-en-1-il, but-2-en-2-il, buta-1,3-dien-1-il, buta-1,3-dien-2-il, ciklobut-1-en-1-il, ciklobut-1-en-3-il, ciklobuta-1,3-dien-1-il, but-1-in-1-il, but-1-in-3-il, but-3-in-1-il, itd.; i slično.

35 Za pojam "alkil" se specifično namjerava da uključuje grupe bilo kojeg stupnja ili razine zasićenosti, drugim riječima, grupe koje imaju isključivo jednostruke veze ugljik-ugljik, grupe koje imaju jednu ili više dvostrukih veza ugljik-ugljik, grupe koje imaju jednu ili više trostrukih veza ugljik-ugljik te grupe koje imaju mješavine jednostrukih, dvostrukih i trostrukih veza ugljik-ugljik. Kada postoji namjera za nekom specifičnom razinom zasićenosti koriste se izrazi "alkanil", "alkenil" i "alkinil". Preferira se da alkil grupa uključuje od jednog do 20 ugljikovih atoma, više se preferira, od jednog do 10 ugljikovih atoma. Fraza ($\text{C}_1\text{-C}_6$) alkil se, na primjer, odnosi na alkil grupu koja sadrži od jednog do šest ugljikovih atoma.

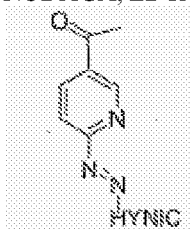
40 Pojam "alkanil" sam po sebi ili kao dio drugog supstituenta odnosi se na zasićeni razgranati, ravnolančani ili ciklički alkil radikal izveden uklanjanjem jednog atoma vodika s jednog atoma ugljika prvobitnog alkana. Tipične alkanil grupe uključuju, ali na taj način da nisu time ograničene, metanil; etanil; propanile kao što su propan-1-il, propan-2-il (izopropil), ciklopropan-1-il, itd.; butanile kao što su butan-1-il, butan-2-il (sec-butil), 2-metil-propan-1-il (izobutil), 2-metil-propan-2-il (t-butil), ciklobutan-1-il, itd.; i slično.

50 Pojam "alkenil" sam po sebi ili kao dio drugog supstituenta odnosi se na nezasićeni razgranati, ravnolančani ili ciklički alkil radikal koji ima najmanje jednu dvostruku vezu ugljik-ugljik, izveden uklanjanjem jednog atoma vodika s jednog atoma ugljika prvobitnog alkena. Grupa može biti ili u cis ili u trans konformaciji oko dvostruke veze (dvostrukih veza). Tipične alkenil grupe uključuju, ali na taj način da nisu time ograničene, etenil; propenile kao što su prop-1-en-1-il, prop-1-en-2-il, prop-2-en-1-il (alil), prop-2-en-2-il, cikloprop-1-en-1-il; cikloprop-2-en-1-il; butenile kao što su but-1-en-1-il, but-1-en-2-il, 2-metil-prop-1-en-1-il, but-2-en-1-il, but-2-en-2-il, buta-1,3-dien-1-il, buta-1,3-dien-2-il, ciklobut-1-en-1-il, ciklobut-1-en-3-il, ciklobuta-1,3-dien-1-il, itd.; i slično.

55 Pojam "alkinil" sam po sebi ili kao dio drugog supstituenta odnosi se na nezasićeni razgranati, ravnolančani ili ciklički alkil radikal koji ima najmanje jednu trostruku vezu ugljik-ugljik, izveden uklanjanjem jednog atoma vodika s jednog atoma ugljika prvobitnog alkina. Tipične alkinil grupe uključuju, ali na taj način da nisu time ograničene, etinil; propinile kao što su prop-1-in-1-il, prop-2-in-1-il, itd.; butinile kao što su but-1-in-1-il, but-1-in-3-il, but-3-in-1-il, itd.; i slično.

Pojam "acil" sam po sebi ili kao dio drugog supstituenta odnosi se na radikal $-C(O)R^{30}$, gdje R^{30} predstavlja vodik, alkil, cikloalkil, cikloheteroalkil, aril, arilalkil, heteroalkil, heteroaril, heteroarilalkil u smislu kako su ovdje definirani. Reprezentativni primjeri uključuju, ali na taj način da nisu time ograničeni, formil, acetil, cikloheksilkarbonil, cikloheksilmetilkarbonil, benzoil, benzilkarbonil i slično.

Pojam "acil kelat" sam po sebi ili kao dio drugog supstituenta odnosi se na radikal $-C(O)R^{31}$ gdje R^{31} predstavlja alkil, cikloalkil, aril u smislu kako su ovdje definirani, supstituirane s kelatirajućom grupom koja veže odgovarajući metal. Reprezentativni primjeri uključuju $-C(O)CH_2CH_2-R^{32}$ gdje R^{32} predstavlja kelatirajuću grupu kao što su, na primjer, DOTA, TETA, poliamino karboksilat (na primjer, NODAGA, EDTA, tricin, $-C(O)CH_2$ -DTPA, itd.)



te gdje je kelatirajuća grupa vezana za metale kao što su markeri koji emitiraju pozitrone (na primjer, ^{18}F , ^{45}Ti , ^{44}Sc , ^{55}Co , ^{61}Cu , ^{64}Cu , ^{66}Ga , ^{68}Ga , ^{75}Br , ^{76}Br , ^{86}I , ^{110}In , ^{124}I , ^{89}Zr , ^{99}Tc), radionuklidi (na primjer, ^{137}Cs , ^{60}Co , ^{131}I , ^{123}I , ^{192}Ir , ^{90}I , ^{67}Ga , ^{99}Tc , ^{123}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In , ^{97}Ru , ^{67}Cu , ^{68}Ga , ^{72}As , ^{89}Zr , ^{90}I , ^{201}Tl , itd.) ili metali iz skupine lantanida.

Pojam "alkoksi" sam po sebi ili kao dio drugog supstituenta odnosi se na radikal $-OR^{33}$ gdje R^{33} predstavlja alkil ili cikloalkil grupu u smislu kako su ovdje definirane. Reprezentativni primjeri uključuju, ali na taj način da nisu time ograničeni, metoksi, etoksi, propoksi, butoksi, cikloheksiloksi i slično.

Pojam "aril" sam po sebi ili kao dio drugog supstituenta odnosi se na monovalentni aromatski ugljikovodični radikal izveden uklanjanjem jednog atoma vodika s jednog atoma ugljika prvobitnog aromatskog sustava prstena. Tipične aril grupe uključuju, ali na taj način da nisu time ograničene, grupe izvedene iz aceantrilena, acenaftilena, acefenaftilena, antracena, azulena, benzena, krisena, koronena, fluorantena, fluorena, heksacena, heksafena, heksalena, *as*-indacena, *s*-indacena, indana, indena, naftalena, oktacena, oktafena, oktalen, ovalena, penta-2,4-diena, pentacena, pentalena, pentafena, perilena, fenalena, fenantrena, picena, plejadena ("pleiadene"), pirena, pirantrena, rubicena, trifenilena, trinaftalena i sličnog. Preferira se da aril grupa uključuje od šest do 20 ugljikovih atoma, više se preferira od šest do 12 ugljikovih atoma.

Pojam "arilalkil" sam po sebi ili kao dio drugog supstituenta odnosi se na aciklički alkil radikal kod kojeg je jedan od atoma vodika koji je vezan za atom ugljika, tipično za terminalni ili sp^3 ugljikov atom, zamijenjen aril grupom. Tipične arilalkil grupe uključuju, ali na taj način da nisu time ograničene, benzil, 2-feniletan-1-il, 2-feniletan-1-il, naftilmetil, 2-naftiletan-1-il, 2-naftiletan-1-il, naftobenzil, 2-naftofeniletan-1-il i slično. Gdje se namjeravaju imenovati specifični alkil dijelovi, koristi se nomenklatura arilalkanil, arilalkenil i/ili arilalkinil. Preferira se da arilalkil grupa predstavlja (C_6 - C_{30}) arilalkil, na primjer, alkanil, alkenil ili alkinil dio arilalkil grupe predstavlja (C_1 - C_{10}) a aril dio predstavlja (C_6 - C_{20}), više se preferira da arilalkil grupa predstavlja (C_6 - C_{20}) arilalkil, na primjer, alkanil, alkenil ili alkinil dio arilalkil grupe predstavlja (C_1 - C_8), a aril dio predstavlja (C_6 - C_{12})

Pojam "cikloalkil" sam po sebi ili kao dio drugog supstituenta odnosi se na zasićeni ili nezasićeni ciklički alkil radikal. Gdje se namjerava imenovati određena razina zasićenosti, koristi se nomenklatura "cikloalkanil" ili "cikloalkenil". Tipične cikloalkil grupe uključuju, ali na taj način da nisu time ograničene, grupe izvedene iz ciklopropana, ciklobutana, ciklopentana, cikloheksana i slično. Preferira se da cikloalkil grupa predstavlja (C_3 - C_{10}) cikloalkil, više se preferira da predstavlja (C_3 - C_7) cikloalkil.

Pojam "cikloheteroalkil" sam po sebi ili kao dio drugog supstituenta odnosi se na zasićeni ili nezasićeni ciklički alkil radikal kod kojeg su jedan ili više ugljikovih atoma (te s njima povezani atomi vodika) nezavisno zamijenjeni s istim ili različitim heteroatomom. Tipični heteroatom koji zamijenuju ugljikov(e) atom(e) uključuju, ali na taj način da nisu time ograničeni, N, P, O, S, Si, itd. Kada se namjerava imenovati specifičnu razinu zasićenosti, koristi se nomenklatura "cikloheteroalkanil" ili "cikloheteroalkenil". Tipične cikloheteroalkil grupe uključuju, ali na taj način da nisu time ograničene, grupe izvedene iz epoksida, azirina, tiirana, imidazolidina, morfolina, piperazina, piperidina, pirazolidina, pirolidina, kinuklidina, i slično.

Pojam "dijagnostički učinkovita količina" označava količinu spoja koja je, kada se daje pacijentu za određivanje i dokazivanje bolesti, dovoljna da odredi i dokaže bolest. "Dijagnostički učinkovita količina" će varirati zavisno od spoja, bolest i njene ozbiljnosti te starosti, tjelesne mase, itd., pacijenta kojeg treba tretirati.

Pojmovi "heteroalkil, heteroalkanil, heteroalkenil i heteroalkinil" sami po sebi ili kao dio drugog supstituenta odnose se na alkil, alkanil, alkenil odnosno alkinil grupe, kod kojih su jedan ili više ugljikovih atoma (i svi s njima povezani atomi vodika) nezavisno zamijenjeni s istim ili različitim heteroatomskim grupama. Tipične heteroatomske grupe koje se mogu uključiti u te grupe uključuju, ali na taj način da nisu time ograničene, -O-, -S-, -O-O-, -S-S-, -O-S-, -NR³⁴R³⁵,
 5 -N=N-,

-N=N-, -N=N-NR³⁶R³⁷, -PR³⁸-, -P(O)₂-, -POR³⁹-, -O-P(O)₂-, -SO-, -SO₂-, -SnR⁴⁰R⁴¹- i slično, pri čemu R³⁴, R³⁵, R³⁶, R³⁷, R³⁸, R³⁹, R⁴⁰ i R⁴¹ nezavisno predstavljaju vodik, alkil, supstituirani alkil, aril, supstituirani aril, arilalkil, supstituirani arilalkil, cikloalkil, supstituirani cikloalkil, cikloheteroalkil, supstituirani cikloheteroalkil, heteroalkil, supstituirani heteroalkil, heteroaril, supstituirani heteroaril, heteroarilalkil ili supstituirani heteroarilalkil.

Pojam "heteroaril" sam po sebi ili kao dio drugog supstituenta odnosi se na monovalentni heteroaromatski radikal izveden uklanjanjem jednog atoma vodika s jednog atoma prvobitnog heteroaromatskog sustava prstena. Tipične heteroaril grupe uključuju, ali na taj način da nisu time ograničene, grupe izvedene iz akridina, arsindola, karbazola, P-karbolina, kromana, kromena, cinolina, furana, imidazola, indazola, indola, indolina, indolizina, izobenzofurana, izokromena, izoindola, izoindolina, izokinolina, izotiazola, izoksazola, naftiridina, oksadiazola, oksazola, perimidina, fenantridina, fenantrolina, fenazina, ftalazina, pteridina, purina, pirana, pirazina, pirazola, piridazina, piridina, pirimidina, pirola, pirolizina, kinazolina, kinolina, kinolizina, kinoksalina, tetrazola, tiadiazola, tiazola, tiofena, triazola, ksantena, i slično. Preferira se da heteroaril grupa predstavlja 5-20-eročlani heteroaril, više se preferira da predstavlja 5-10-eročlani heteroaril. Preferiraju se one heteroaril grupe koje su izvedene iz tiofena, pirola, benzo(tiofena), benzofurana, indola, piridina, kinolina, imidazola, oksazola i pirazina

Pojam "heteroarilalkil" sam po sebi ili kao dio drugog supstituenta odnosi se na aciklički alkil radikal kod kojeg je jedan od atoma vodika, koji je vezan za ugljikov atom, tipično terminalni ili *sp*³ ugljikov atom, zamijenjen s heteroaril grupom. Gdje se namjerava imenovati specifične alkil dijelove, koristi se nomenklatura heteroarilalkanil, heteroarilalkenil i/ili heteroarilalkinil. U aspektima koji se preferiraju, heteroarilalkil grupa predstavlja 6-30-eročlani heteroarilalkil, na primjer, alkanil, alkenil ili alkinil dio heteroarilalkila je 1-10-eročlani, a heteroaril dio predstavlja 5-20-eročlani heteroaril, više se preferira 6-20-eročlani heteroarilalkil, na primjer, alkanil, alkenil ili alkinil dio heteroarilalkila je 1-8-eročlani, a heteroaril dio predstavlja 5-12-eročlani heteroaril.

Pojam "imino" sam po sebi ili kao dio drugog supstituenta odnosi se na radikal -C=NR⁴², pri čemu R⁴² predstavlja vodik, alkil, cikloalkil, cikloheteroalkil, aril, arilalkil, heteroalkil, heteroaril, heteroarilalkil u smislu kako su ovdje definirani.

Pojam "prvobitni aromatski sustav prstena" odnosi se na nezasićeni ciklički ili policiklički sustav prstena koji ima konjugirani π sustav elektrona. Specifično su uključeni unutar definicije "prvobitnog aromatskog sustava prstena" fuzionirani sustavi prstena kod kojih jedan ili više prstena predstavljaju aromatski prsten, a jedan ili više prstena su zasićeni ili nezasićeni, kao što su, na primjer, fluoren, indan, inden, fenalen, itd. Tipični prvobitni aromatski sustavi prstena uključuju, ali na taj način da nisu time ograničeni, aceantrilen, acenaftilen, acefenantrilen, antracen, azulen, benzen, krisen, koronen, fluoranten, fluoren, heksacen, heksafen, heksalen, *as*-indacen, *s*-indacen, indan, inden, naftalen, oktacen, oktafen, oktalen, ovalen, penta-2,4-dien, pentacen, pentalen, pentafen, perilen, fenalen, fenantren, piccen, plejaden ("pleiadene"), piren, pirantren, rubicen, trifenilen, trinaftalen i slično.

Pojam "prvobitni heteroaromatski sustav prstena" odnosi se na prvobitni aromatski sustav prstena kod kojeg su jedan ili više ugljikovih atoma (i svi s njima povezani atomi vodika) nezavisno zamijenjeni s istim ili različitim heteroatomima. Tipični heteroatomski za zamjenu ugljikovih atoma uključuju, ali na taj način da nisu time ograničeni, N, P, O, S, Si, itd. Specifično su uključeni unutar definicije "prvobitnih heteroaromatskih sustava prstena" fuzionirani sustavi prstena kod kojih jedan ili više prstena predstavljaju aromatski prsten te su jedan ili više prstena zasićeni ili nezasićeni, kao što su, na primjer, arsindol, benzodioksan, benzofuran, kroman, kromen, indol, indolin, ksanten, itd. Tipični prvobitni heteroaromatski sustavi prstena uključuju, ali na taj način da nisu time ograničeni, arsindol, karbazol, β -karbolin, kroman, kromen, cinolin, furan, imidazol, indazol, indol, indolin, indolizin, izobenzofuran, izokromen, izoindol, izoindolin, izokinolin, izotiazol, izoksazol, naftiridin, oksadiazol, oksazol, perimidin, fenantridin, fenantrolin, fenazin, ftalazin, pteridin, purin, piran, pirazin, pirazol, piridazin, piridin, pirimidin, pirol, pirolizin, kinazolin, kinolin, kinolizin, kinoksalin, tetrazol, tiadiazol, tiazol, tiofen, triazol, ksanten, i slično.

Pojam "pacijent" uključuje ljude. Pojmovi "čovjek" i "pacijent" se ovdje koriste naizmjenično.

Pojam "farmaceutski prihvatljiva sol" odnosi se na sol spoja izuma, koja je farmaceutske prihvatljiva i posjeduje željeno farmakološko djelovanje prvobitnog spoja. Takve soli uključuju: (1) kisele adicijske soli, oblikovane s anorganskim kiselinama kao što su klorovodična kiselina, bromovodična kiselina, sumporna kiselina, dušična kiselina, fosforna kiselina, i slično; ili oblikovane s organskim kiselinama kao što su octena kiselina, propionska kiselina, heksanojska kiselina, ciklopentanpropionska kiselina, glikolna kiselina, piruvatna kiselina, mliječna kiselina, malonska kiselina, jantarna kiselina, jabučna kiselina, maleinska kiselina, fumarna kiselina, vinska kiselina, limunska kiselina, benzojeva

kiselina, 3-(4-hidroksibenzoil)benzojeva kiselina, cimetna kiselina, bademova kiselina, metansulfonska kiselina, etansulfonska kiselina, 1,2-etan-disulfonska kiselina, 2-hidroksietansulfonska kiselina, benzensulfonska kiselina, 4-klor benzensulfonska kiselina, 2-naftalensulfonska kiselina, 4-toluensulfonska kiselina, kamforsulfonska kiselina, 4-metil biciklo[2.2.2]-okt-2-en-1-karboksilna kiselina, glukohexonska kiselina, 3-fenilpropionska kiselina, trimetiloctena kiselina, tercijarna butilactena kiselina, lauril sumporna kiselina, glukonska kiselina, glutamska kiselina, hidroksinaftojska kiselina, salicilna kiselina, stearinska kiselina, mukonska kiselina, i slično; ili (2) soli oblikovane kada se kiseli proton prisutan u prvobitnom spoju zamijeni metalnim ionom, na primjer, alkalijskim metalnim ionom, zemno alkalijskim ionom, ili aluminijevim ionom; ili koordinira s organskom bazom kao što su etanolamin, dietanolamin, trietanolamin, N-metilglukamin i slično.

"Farmaceutski prihvatljiv prijenosnik" odnosi se na razrijeđivač, pomoćnu tvar, ekscipijent ili nosivu tvar s kojom se spoj izuma daje.

Pojam "sprječavanje" odnosi se na smanjenje rizika obolijavanja od bolesti ili poremećaja (drugim riječima, uzrokovanje da se najmanje jedan od kliničkih simptoma bolesti ne razvije kod pacijenta koji može biti izložen bolesti ili predisponiran za bolest ali nije još iskusio simptome ili se kod njega nisu ispoljili simptomi bolesti).

Pojam "supstituiran" odnosi se na grupu kod koje su jedan ili više atoma vodika nezavisno zamijenjeni s istim ili različitim supstituentom (supstituentima). Tipični supstituenti uključuju, ali na taj način da nisu time ograničeni, -M, -R⁶⁰, -O-, =O, -OR⁶⁰, -SR⁶⁰, -S-, =S, -NR⁶⁰R⁶¹, =NR⁶⁰, CF₃, -CN, -OCN, -SCN, -NO, -NO₂, =N₂, -N₃, -S(O)₂O⁻, -S(O)₂OH, -S(O)₂R⁶⁰, -OS(O₂)O⁻, -OS(O₂)R⁶⁰, -P(O)(O⁻)₂, -P(O)(OR⁶⁰)(O⁻), -OP(O)(OR⁶⁰)(OR⁶¹), -C(O)R⁶⁰, -C(S)R⁶⁰, -C(O)OR⁶⁰, -C(O)NR⁶⁰R⁶¹, -C(O)O⁻, -C(S)OR⁶⁰, NR⁶²C(O)NR⁶⁰R⁶¹, -NR⁶²C(S)NR⁶⁰R⁶¹, -NR⁶²C(NR⁶³)NR⁶⁰R⁶¹ te -C(NR⁶²)NR⁶⁰R⁶¹ pri čemu M nezavisno predstavlja halogen; R⁶⁰, R⁶¹, R⁶² i R⁶³ nezavisno predstavljaju vodik, alkil, supstituirani alkil, alkoksi, supstituirani alkoksi, cikloalkil, supstituirani cikloalkil, cikloheteroalkil, supstituirani cikloheteroalkil, aril, supstituirani aril, heteroaril ili supstituirani heteroaril, ili opcionalno R⁶⁰ i R⁶¹ zajedno s dušikovim atomom na koji su vezani oblikuju cikloheteroalkilni ili supstituirani cikloheteroalkilni prsten; a R⁶⁴ i R⁶⁵ nezavisno predstavljaju vodik, alkil, supstituirani alkil, aril, cikloalkil, supstituirani cikloalkil, cikloheteroalkil, supstituirani cikloheteroalkil, aril, supstituirani aril, heteroaril ili supstituirani heteroaril, ili opcionalno R⁶⁴ i R⁶⁵ zajedno s dušikovim atomom na koji su vezani oblikuju cikloheteroalkilni ili supstituirani cikloheteroalkilni prsten. Preferira se da, supstituenti uključuju -M, -R⁶⁰, =O, -OR⁶⁰, -SR⁶⁰, -S-, =S, -NR⁶⁰R⁶¹, =NR⁶⁰, CF₃, -CN, -OCN, -SCN, -NO, -NO₂, =N₂, -N₃, -S(O)₂R⁶⁰, -OS(O₂)O⁻, -OS(O₂)R⁶⁰, -P(O)(O⁻)₂, -P(O)(OR⁶⁰)(O⁻), -OP(O)(OR⁶⁰)(OR⁶¹), -C(O)R⁶⁰, -C(S)R⁶⁰, -C(O)OR⁶⁰, -C(O)NR⁶⁰R⁶¹, -C(O)O⁻, NR⁶²C(O)NR⁶⁰R⁶¹, više se preferira -M, -R⁶⁰, =O, -OR⁶⁰, -SR⁶⁰, -NR⁶⁰R⁶¹, CF₃, -CN, -NO₂, -S(O)₂R⁶⁰, -P(O)(OR⁶⁰)(O⁻), -OP(O)(OR⁶⁰)(OR⁶¹), -C(O)R⁶⁰, -C(O)OR⁶⁰, -C(O)NR⁶⁰R⁶¹, -C(O)O⁻, najviše se preferira -M, -R⁶⁰, =O, -OR⁶⁰, -SR⁶⁰, -NR⁶⁰R⁶¹, CF₃, -CN, -NO₂, -S(O)₂R⁶⁰, -OP(O)(OR⁶⁰)(OR⁶¹), -C(O)R⁶⁰, -C(O)OR⁶⁰, -C(O)O⁻, pri čemu R⁶⁰, R⁶¹ i R⁶² predstavljaju značenja kao što je definirano gore.

Pojmovi "tretiranje" ili "tretman" bilo koje bolesti ili poremećaja odnosi se, u jednom aspektu, na poboljšanje bolesti ili poremećaja (drugim riječima, zaustavljanje ili smanjenje razvoja bolesti ili najmanje jednog od njenih kliničkim simptoma). U slijedećem aspektu "tretiranje" ili "tretman" odnosi se na poboljšavanje najmanje jednog fizičkog pokazatelja, koji se ne može prepoznati od strane pacijenta. U slijedećem aspektu, "tretiranje" ili "tretman" odnosi se na inhibiranje bolesti ili poremećaja, bilo fizički, (na primjer, stabilizacija vidljivog simptoma), fiziološki, (na primjer, stabilizacija fizičkog pokazatelja), ili na oba načina. U slijedećem aspektu, "tretiranje" ili "tretman" odnosi se na odgađanje početka bolesti ili poremećaja.

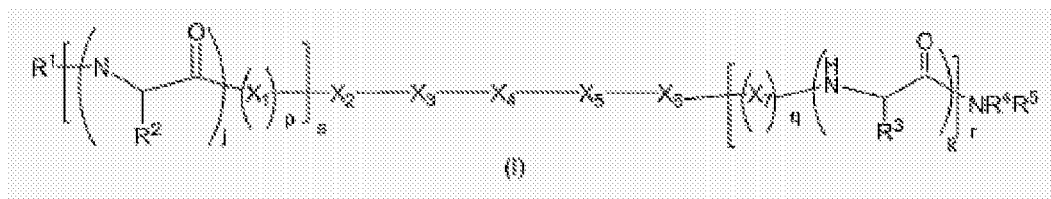
Pojam "terapeutske učinkovite količine" označuje količinu spoja koja je, kada se daje pacijentu za tretiranje bolesti, dovoljna da izvrši takav tretman bolesti. "Terapeutske učinkovite količine" će varirati zavisno od spoja, bolesti i njene ozbiljnosti, te starosti, tjelesne mase, itd., pacijenta kojeg treba tretirati.

Sada će se detaljno uputiti na preferirane aspekte izuma. Makar će izum biti opisan vezano uz preferirane aspekte, podrazumijeva se da ne postoji namjera da se izum ograniči na te preferirane aspekte. Baš suprotno, namjera je da obuhvati sve alternative, modifikacije, i ekvivalente koliko god mogu biti uključeni unutar duha i područja izuma kao što je definirano priključenim zahtjevima.

Spojevi izuma

Ovaj izum zadovoljava ove i ostale potrebe pružajući peptidne analoge spoja Ac-PHSCN-NH₂ koji su usmjereni na tumor i endotelne stanice te imaju protutumorsko, antiangiogenično te antimetastatsko djelovanje, zatim metode izrade tih peptida, njihove mješavine i metode korištenja tih peptida i njihovih farmaceutskih mješavina za tretiranje, sprječavanje te određivanje i dokazivanje bolesti karakteriziranih rastom tumora, metastazama i angiogenezom. Peptidni analozi mogu služiti, između ostalog, kao prijenosnici radioaktivnosti, PET- aktivnih spojeva, toksina, fluorescentnih molekula i PEG molekula.

U skladu s time, u jednom aspektu, ovaj izum pruža spoj formule(I) :



ili njihovu farmaceutski prihvatljivu sol, solvat, hidrat ili N-oksid pri čemu:

j i k nezavisno predstavljaju 0 ili 1;

p i q nezavisno predstavljaju cijeli broj između i uključujući 0 i 100;

r i s nezavisno predstavljaju 0 ili 1;

R¹ predstavlja acil, supstituirani acil, acil kelat, alkil, supstituirani alkil, cikloalkil, supstituirani cikloalkil, imino ili supstituirani imino;

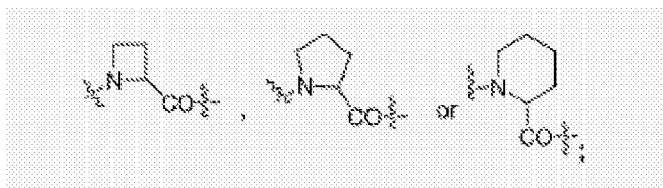
R² predstavlja C₁-C₆ alkil pri čemu je najmanje jedan atom vodika zamijenjen supstituentom odabranim iz grupe koja se sastoji od: -NR⁶R⁷, -OR⁸, -CO₂R⁹, -S(O)_zR¹⁰, -P(OR¹¹)OR¹², aril i supstituirani aril;

R⁶, R⁷, R⁸, R⁹, R¹⁰, R¹¹ i R¹² su nezavisno odabrani iz grupe koja se sastoji od: vodik, acil, supstituirani acil, acil kelat, alkil, supstituirani alkil, cikloalkil, supstituirani cikloalkil, imino i supstituirani imino;

X₁ predstavlja -NH(C=C)_gCO-, -NH(CH₂)_nCO- ili -NHCH(CH₃)CO-;

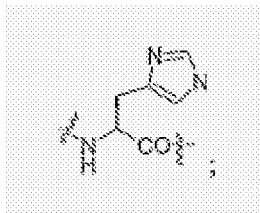
g i h nezavisno predstavljaju 1, 2, 3, 4, 5 ili 6

X₂ predstavlja

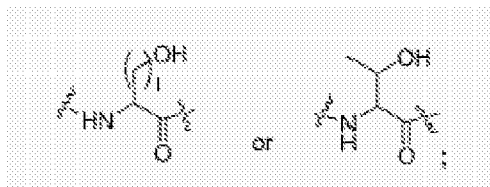


Ključ uz sliku: or = ili

5 X₃ predstavlja



X₄ predstavlja

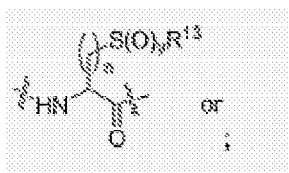


Ključ uz sliku: or = ili

10

1 predstavlja cijeli broj od 1 do 4;

X₅ predstavlja



15

Ključ uz sliku: or = ili

R¹³ predstavlja vodik, alkil, supstituirani alkil, acil, supstituirani acil, arilalkil, supstituirani arilalkil, aril, supstituirani aril ili -S(O)_xR¹⁴;

20

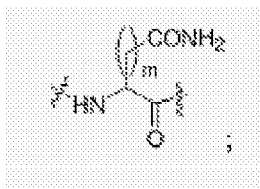
n predstavlja cijeli broj od 1 do 5;

R¹⁴ predstavlja alkil, supstituirani alkil, acil, supstituirani acil, arilalkil, supstituirani arilalkil, aril ili supstituirani aril;

y i x nezavisno predstavljaju 0, 1 ili 2;

25

X₆ predstavlja



m predstavlja cijeli broj 1, 2, 3 ili 4;

30

X₇ predstavlja -NH(C=C)₄CO-, -NH(CH₂)CO- ili -NHCH(CH₃)CO-;

d i e nezavisno predstavljaju 1, 2, 3, 4, 5 ili 6;

R³ predstavlja C₁-C₆ alkil pri čemu je najmanje jedan atom vodika zamijenjen supstutuentom odabranim iz grupe koja se sastoji od: -NR¹⁵R¹⁶, -OR¹⁷, -CO₂R¹⁸, -S(O)_nR¹⁹, -P(OR²⁰)R²¹, aril i supstituirani aril;

35

R⁴ i R⁵ nezavisno predstavljaju vodik, alkil ili supstituirani alkil; a

R^{15} , R^{16} , R^{17} , R^{18} , R^{19} , R^{20} i R^{21} su nezavisno odabrani iz grupe koja se sastoji od: vodik, acil, supstituirani acil, acil kelat, alkil, supstituirani alkil, cikloalkil, supstituirani cikloalkil, imino i supstituirani imino;

- 5 uz uvjet da R^1 ne predstavlja acetil kada R^4 i R^5 predstavljaju vodik, a r i s predstavljaju 0.

U jednom aspektu, R^1 ne predstavlja acetil kada R^4 i R^5 predstavljaju vodik.

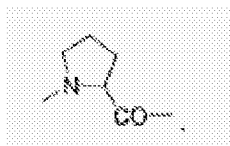
- 10 U jednom aspektu, p i q nezavisno predstavljaju cijeli broj između i uključujući 1 i 50. U slijedećem aspektu, p i q nezavisno predstavljaju cijeli broj između i uključujući 1 i 25. U još jednom slijedećem aspektu, p i q nezavisno predstavljaju cijeli broj između i uključujući 1 i 10. U još jednom slijedećem aspektu, p i q nezavisno predstavljaju cijeli broj između i uključujući 1 i 5. U još jednom slijedećem aspektu, p i q nezavisno predstavljaju cijeli broj između i uključujući 1 i 3.

- 15 U jednom aspektu, p i q nezavisno predstavljaju cijeli broj između i uključujući 0 i 50. U slijedećem aspektu, p i q nezavisno predstavljaju cijeli broj između i uključujući 0 i 25. U još jednom slijedećem aspektu, p i q nezavisno predstavljaju cijeli broj između i uključujući 0 i 10. U još jednom slijedećem aspektu, p i q nezavisno predstavljaju cijeli broj između i uključujući 0 i 5. U još jednom slijedećem aspektu, p i q nezavisno predstavljaju cijeli broj između i uključujući 0 i 3.

- 20 U još jednom slijedećem aspektu, s predstavlja 0, a r predstavlja 1. U još jednom slijedećem aspektu, s predstavlja 1, a r predstavlja 0. U još jednom slijedećem aspektu, najmanje jedan od s i r ne predstavlja 0.

- 25 U još jednom slijedećem aspektu, R^1 predstavlja acil, supstituirani acil, acil kelat, imino ili supstituirani imino. U još jednom slijedećem aspektu, R^2 predstavlja C_1 - C_6 alkil pri čemu je najmanje jedan atom vodika zamijenjen supstituentom odabranim iz grupe koja se sastoji od: $-NR^6R^7$, $-OR^8$ i $-CO_2R^9$. U još jednom slijedećem aspektu, R^6 , R^7 , R^8 , R^9 , R^{10} , R^{11} i R^{12} su nezavisno odabrani iz grupe koja se sastoji od: vodik, acil, supstituirani acil, acil kelat, imino ili supstituirani imino.

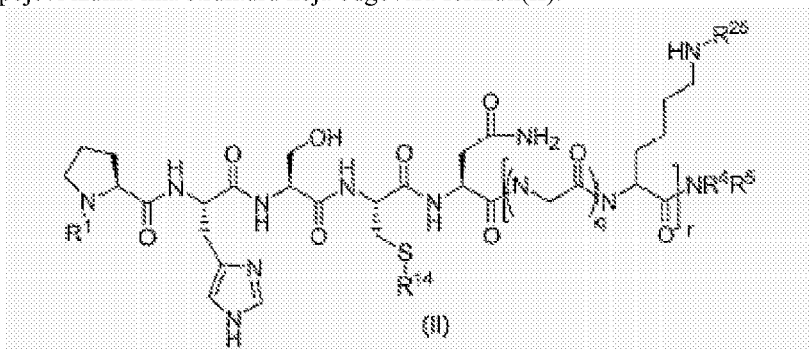
- 30 U još jednom slijedećem aspektu, X_1 predstavlja $-NHCH_2CO-$ ili $-NHCH(CH_3)CO-$. U još jednom slijedećem aspektu, X_2 predstavlja



- 35 U još jednom slijedećem aspektu, l predstavlja 1. U još jednom slijedećem aspektu, n predstavlja 1 ili 2. U još jednom slijedećem aspektu, m predstavlja 1 ili 2.

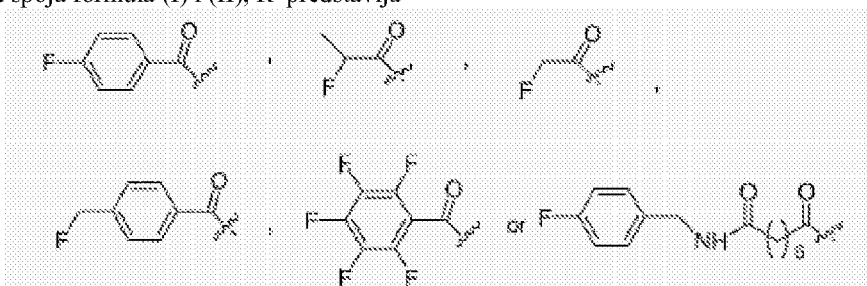
- 40 U još jednom slijedećem aspektu, R^3 predstavlja C_1 - C_6 alkil pri čemu je najmanje jedan atom vodika zamijenjen supstituentom koji je odabran iz grupe koja se sastoji od: $-NR^{15}R^{16}$, OR^{17} i $-CO_2R^{18}$. U još jednom slijedećem aspektu, R^{15} , R^{16} , R^{17} , R^{18} , R^{19} , R^{20} i R^{21} su nezavisno odabrani iz grupe koja se sastoji od: vodik, acil, supstituirani acil, acil kelat, imino ili supstituirani imino.

U jednom aspektu, spojevi izuma ima strukturu koja odgovara formuli(II):



pri čemu:

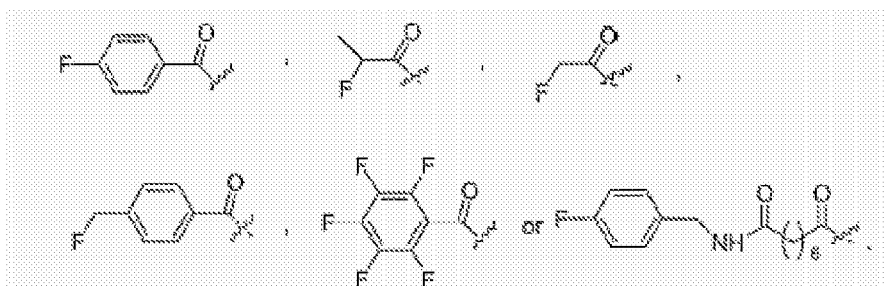
- 5 R^1 predstavlja acil, supstituirani acil, acil kelat, alkil, supstituirani alkil, imino ili supstituirani imino;
- R^4 predstavlja vodik;
- R^5 predstavlja vodik, alkil ili supstituirani alkil; a
- 10 R^{25} predstavlja vodik, acil, supstituirani acil, acil kelat, alkil, supstituirani alkil, imino ili supstituirani imino; a
- q predstavlja 1, 2, 3, 4 ili 5.
- 15 U jednom aspektu spoja formula (I) i (II), R^1 predstavlja



Ključ uz sliku: or = ili

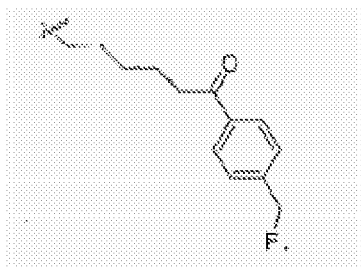
- 20 a R^{14} predstavlja vodik, metil ili acetil. U jednom specifičnom aspektu, $r = 0$ a R^4 i R^5 predstavljaju vodik. U drugom specifičnom aspektu, $r = 1$, q predstavlja 2, R^4 , R^5 i R^{25} predstavljaju vodik.

U slijedećem aspektu spoja formula (I) i (II), $r = 1$, q predstavlja 2, R^{14} predstavlja vodik, metil ili acetil, a R^{25} predstavlja



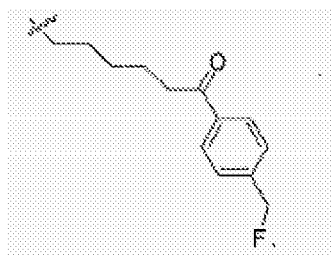
- 25 Ključ uz sliku: or = ili

U slijedećem aspektu spoja formula (I) i (II), $r = 0$, R^1 predstavlja acetil, R^4 predstavlja vodik, R^{14} predstavlja vodik, metil ili acetil a R^5 predstavlja

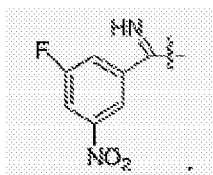


5

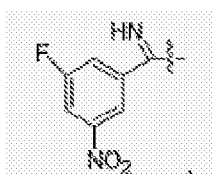
U još jednom slijedećem aspektu spoja formula (I) i (II), $r = 1$, q predstavlja 2, R^1 predstavlja acetil, R^4 i R^{25} predstavljaju vodik, R^{14} predstavlja vodik, metil ili acetil a R^5 predstavlja



10 U još jednom slijedećem aspektu spoja formula (I) i (II), $r = 0$, R^4 i R^5 predstavljaju vodik, R^{14} predstavlja vodik, metil ili acetil, a R^1 predstavlja

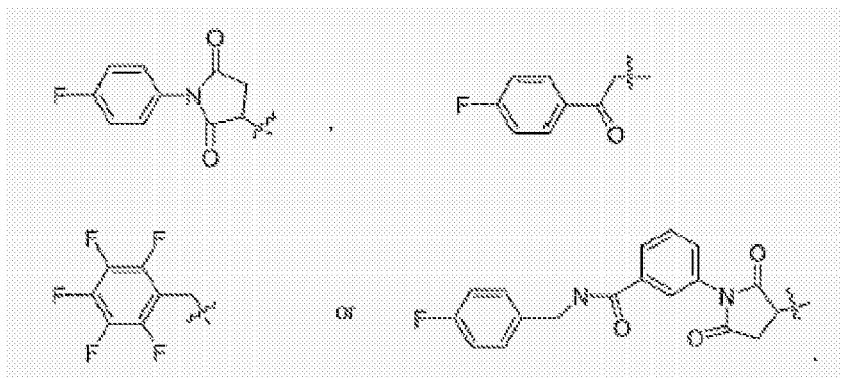


15 U još jednom slijedećem aspektu spoja formula (I) i (II), $r = 1$, $q = 2$, R^1 - acetil, R^4 i R^5 predstavljaju vodik, R^{14} predstavlja vodik, metil ili acetil, a R^{25} predstavlja



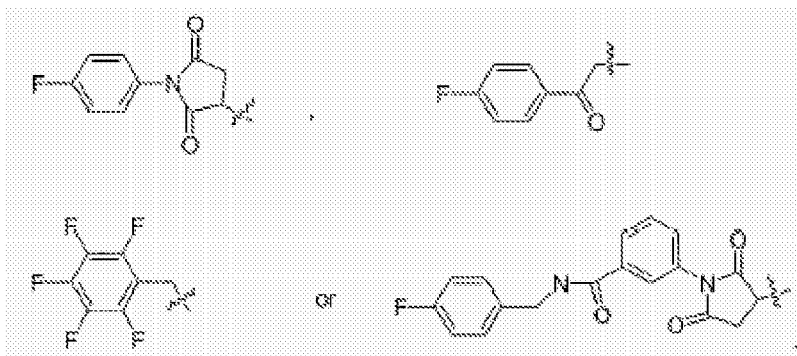
U još jednom slijedećem aspektu spoja formula (I) i (II), $r = 0$, R^4 i R^5 predstavljaju vodik, R^{14} predstavlja vodik, metil ili acetil, a R^1 predstavlja

20



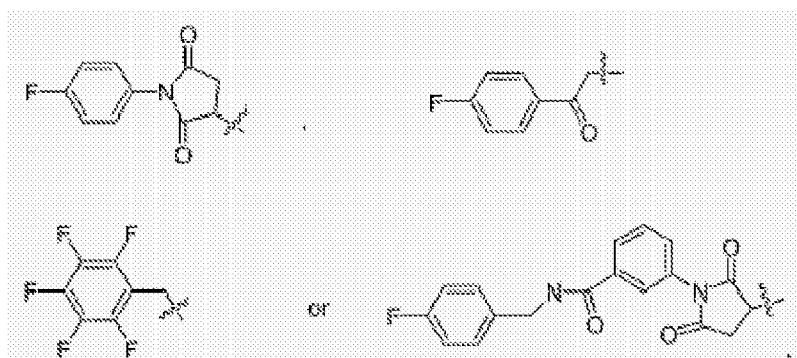
Ključ uz sliku: or = ili

25 U još jednom slijedećem aspektu spoja formula (I) i (II), $r = 1$, $q = 2$, R^4 , R^5 i R^{25} predstavljaju vodik, R^{14} predstavlja vodik, metil ili acetil, a R^1 predstavlja



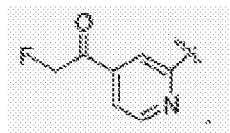
Ključ uz sliku: or = ili

- 5 U još jednom slijedećem aspektu spoja formula (I) i (II), $r = 1$, $q = 2$, R^1 predstavlja acetil, R^4 i R^5 predstavlja vodik, R^{14} predstavlja vodik, metil ili acetil, a R^{25} predstavlja

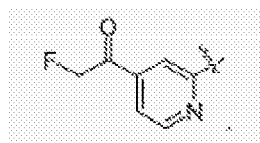


Ključ uz sliku: or = ili

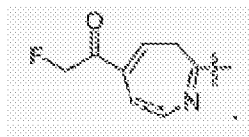
- 10 U još jednom slijedećem aspektu spoja formula (I) i (II), $r = 0$, R^4 i R^5 predstavlja vodik, R^{14} predstavlja vodik, metil ili acetil, a R^1 predstavlja



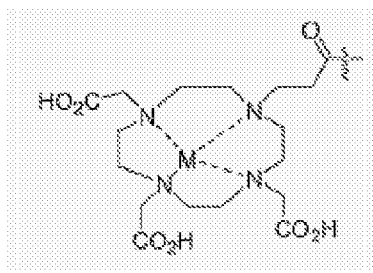
- 15 U još jednom slijedećem aspektu spoja formula (I) i (II), $r = 1$, $q = 2$, R^4 , R^5 i R^{25} predstavlja vodik, R^{14} predstavlja vodik, metil ili acetil, a R^1 predstavlja



- 20 U još jednom slijedećem aspektu spoja formula (I) i (II), $r = 1$, $q = 2$, R^1 predstavlja acetil, R^4 i R^5 predstavlja vodik, R^{14} predstavlja vodik, metil ili acetil, a R^{25} predstavlja

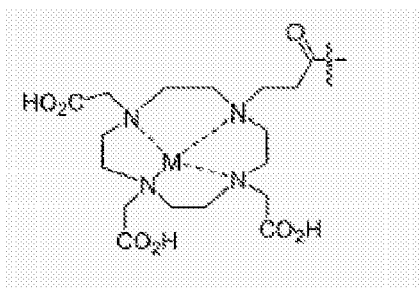


U još jednom slijedećem aspektu spoja formula (I) i (II), $r = 0$, R^4 i R^5 predstavlja vodik, R^{14} predstavlja vodik, metil ili acetil, a R^1 predstavlja



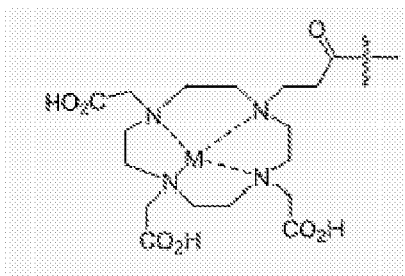
a M predstavlja Cu, Ga, ^{111}In ili ^{90}Y .

- 5 U još jednom slijedećem aspektu spoja formula (I) i (II), $r = 1$, $q = 2$, R^4 , R^5 i R^{25} predstavljaju vodik, R^{14} predstavlja vodik, metil ili acetil, R^1 predstavlja



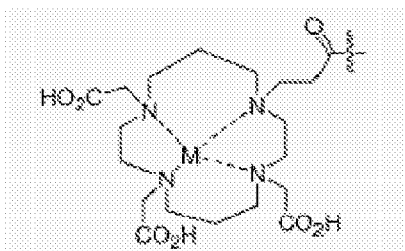
a M predstavlja Cu, Ga, ^{111}In ili ^{90}Y .

- 10 U još jednom slijedećem aspektu spoja formula (I) i (II), $r = 1$, $q = 2$, R^1 predstavlja acetil, R^4 i R^5 predstavljaju vodik, R^{14} predstavlja vodik, metil ili acetil, R^{25} predstavlja



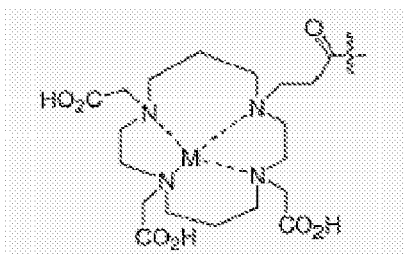
- 15 a M predstavlja Cu, Ga, ^{111}In ili ^{90}Y .

U još jednom slijedećem aspektu spoja formula (I) i (II), $r = 0$, R^4 i R^5 predstavljaju vodik, R^{14} predstavlja vodik, metil ili acetil, a R^1 predstavlja



5 a M predstavlja Cu.

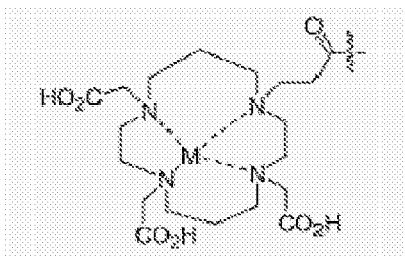
U još jednom slijedećem aspektu spoja formula (I) i (II), $r = 1$, $q = 2$, R^4 , R^5 i R^{25} predstavljaju vodik, R^{14} predstavlja vodik, metil ili acetil, R^1 predstavlja



10 a M predstavlja Cu.

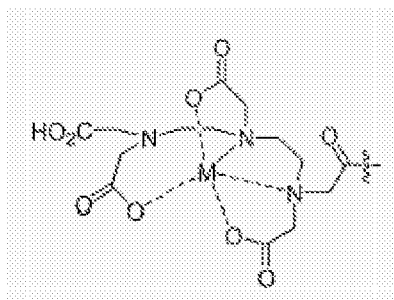
U još jednom slijedećem aspektu spoja formula (I) i (II), $r = 1$, $q = 2$, R^1 predstavlja acetil, R^4 i R^5 predstavljaju vodik, R^{14} predstavlja vodik, metil ili acetil, R^{25} predstavlja

15



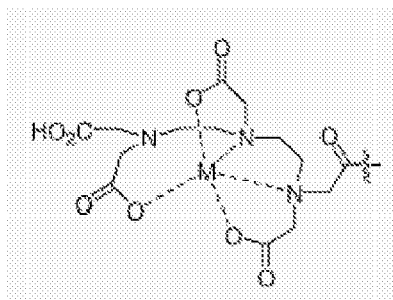
a M predstavlja Cu.

20 U još jednom slijedećem aspektu spoja formula (I) i (II), $r = 0$, R^4 i R^5 predstavljaju vodik, R^{14} predstavlja vodik, metil ili acetil, a R^1 predstavlja



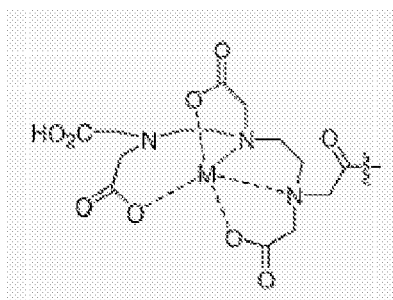
a M predstavlja ^{111}In , ^{90}Y ili Ga.

U još jednom slijedećem aspektu spoja formula (I) i (II), $r = 1$, $q = 2$, R^4 , R^5 i R^{25} predstavljaju vodik, R^{14} predstavlja vodik, metil ili acetil, R^1 predstavlja



5 a M predstavlja ^{111}In , ^{90}Y ili Ga.

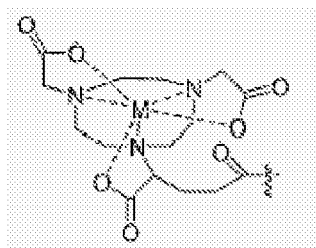
U još jednom slijedećem aspektu spoja formula (I) i (II), $r = 1$, $q = 2$, R^1 predstavlja acetil, R^4 i R^5 predstavljaju vodik, R^{14} predstavlja vodik, metil ili acetil, R^{25} predstavlja



10 a M predstavlja ^{111}In , ^{90}Y ili Ga.

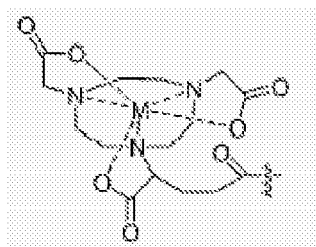
U još jednom slijedećem aspektu spoja formula (I) i (II), $r = 0$, R^4 i R^5 predstavljaju vodik, R^{14} predstavlja vodik, metil ili acetil, R^1 predstavlja

15



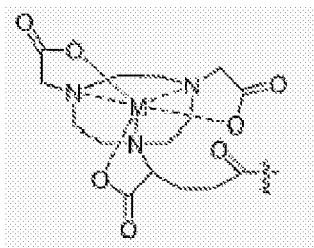
a M predstavlja ^{111}In , ^{67}Ga ili ^{68}Ga .

20 U još jednom slijedećem aspektu spoja formula (I) i (II), $r = 1$, $q = 2$, R^4 , R^5 i R^{25} predstavljaju vodik, R^{14} predstavlja vodik, metil ili acetil, R^1 predstavlja



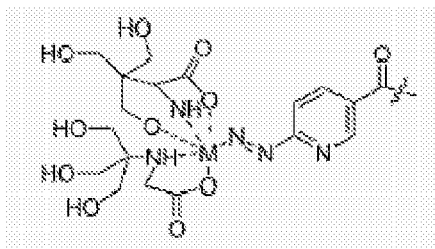
a M predstavlja ^{111}In , ^{67}Ga ili ^{68}Ga .

25 U još jednom slijedećem aspektu spoja formula (I) i (II), $r = 1$, $q = 2$, R^1 predstavlja acetil, R^4 i R^5 predstavljaju vodik, R^{14} predstavlja vodik, metil ili acetil, R^{25} predstavlja



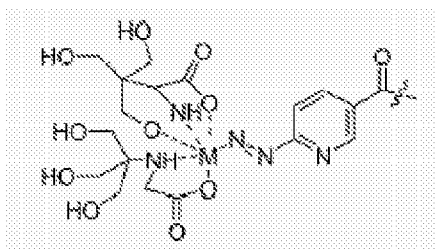
a M predstavlja ^{111}In , ^{67}Ga ili ^{68}Ga .

5 U još jednom slijedećem aspektu spoja formula (I) i (II), gdje $r = 0$, R^4 i R^5 predstavljaju vodik, R^{14} predstavlja vodik, metil ili acetil, R^1 predstavlja



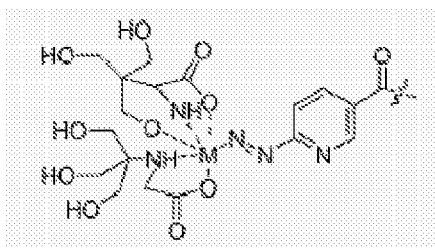
10 a M predstavlja Tc.

U još jednom slijedećem aspektu spoja formula (I) i (II), $r = 1$, $q = 2$, R^4 , R^5 i R^{25} predstavljaju vodik, R^{14} predstavlja vodik, metil ili acetil, R^1 predstavlja



15 a M predstavlja Tc.

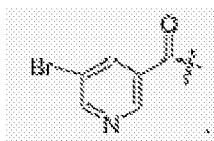
U još jednom slijedećem aspektu spoja formula (I) i (II), $r = 1$, $q = 2$, R^1 predstavlja acetil, R^4 i R^5 predstavljaju vodik, R^{14} predstavlja vodik, metil ili acetil, R^{25} predstavlja



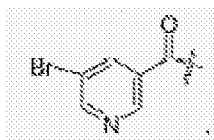
20

a M predstavlja Tc.

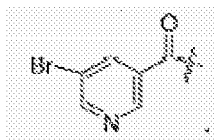
U još jednom slijedećem aspektu spoja formula (I) i (II), $r = 0$, R^4 i R^5 predstavljaju vodik, R^{14} predstavlja vodik, metil ili acetil, a R^1 predstavlja



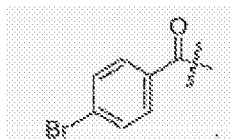
- 5 U još jednom slijedećem aspektu spoja formula (I) i (II), gdje $r = 1$, $q = 2$, R^4 , R^5 i R^{25} predstavljaju vodik, R^{14} predstavlja vodik, metil ili acetil, a R^1 predstavlja



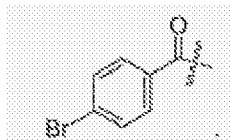
- 10 U još jednom slijedećem aspektu spoja formula (I) i (II), gdje $r = 1$, $q = 2$, R^1 predstavlja acetil, R^4 i R^5 predstavljaju vodik, R^{14} predstavlja vodik, metil ili acetil, a R^{25} predstavlja



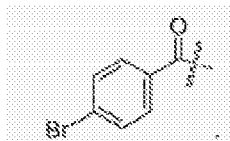
- 15 U još jednom slijedećem aspektu spoja formula (I) i (II), $r = 0$, R^4 i R^5 predstavljaju vodik, R^{14} predstavlja vodik, metil ili acetil, a R^1 predstavlja



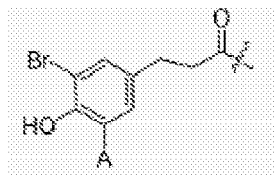
U još jednom slijedećem aspektu spoja formula (I) i (II), $r = 1$, $q = 2$, R^4 , R^5 i R^{25} predstavljaju vodik, R^{14} predstavlja vodik, metil ili acetil, a R^1 predstavlja



- 20 U još jednom slijedećem aspektu spoja formula (I) i (II), $r = 1$, $q = 2$, R^1 predstavlja acetil, R^4 i R^5 predstavljaju vodik, R^{14} predstavlja vodik, metil ili acetil, a R^{25} predstavlja

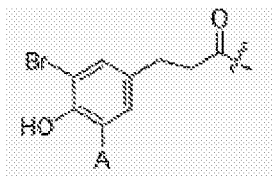


- 25 U još jednom slijedećem aspektu spoja formula (I) i (II), $r = 0$, R^4 i R^5 predstavljaju vodik, R^{14} predstavlja vodik, metil ili acetil, a R^1 predstavlja



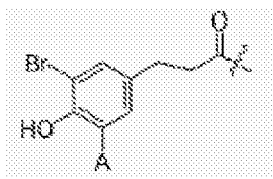
A predstavlja H ili Br

U još jednom slijedećem aspektu spoja formula (I) i (II), $r = 1$, $q = 2$, R^5 , R^5 i R^{25} predstavljaju vodik, R^{14} predstavlja vodik, metil ili acetil, a R^1 predstavlja



5 A predstavlja H ili Br

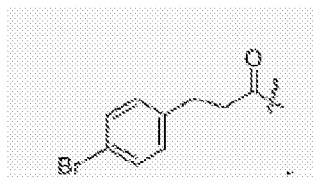
U još jednom slijedećem aspektu spoja formula (I) i (II), $r = 1$, $q = 2$, R^1 predstavlja acetil, R^4 i R^5 predstavljaju vodik, R^{14} predstavlja vodik, metil ili acetil, a R^{25} predstavlja



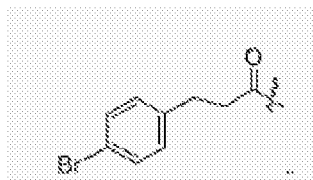
10 A predstavlja H ili Br

U još jednom slijedećem aspektu spoja formula (I) i (II), $r = 0$, R^4 i R^5 predstavljaju vodik, R^{14} predstavlja vodik, metil ili acetil, a R^1 predstavlja

15

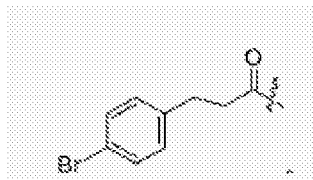


U još jednom slijedećem aspektu spoja formula (I) i (II), $r = 1$, $q = 2$, R^4 , R^5 i R^{25} predstavljaju vodik, R^{14} predstavlja vodik, metil ili acetil, a R^1 predstavlja



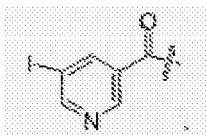
20

U još jednom slijedećem aspektu spoja formula (I) i (II), $r = 1$, $q = 2$, R^1 predstavlja acetil, R^4 i R^5 predstavljaju vodik, R^{14} predstavlja vodik, metil ili acetil, a R^{25} predstavlja

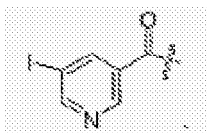


25

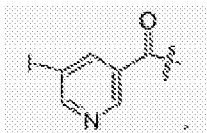
U još jednom slijedećem aspektu spoja formula (I) i (II), $r = 0$, R^4 i R^5 predstavljaju vodik, R^{14} predstavlja vodik, metil ili acetil, a R^1 predstavlja



30 U još jednom slijedećem aspektu spoja formula (I) i (II), $r = 1$, $q = 2$, R^4 , R^5 i R^{25} predstavljaju vodik, R^{14} predstavlja vodik, metil ili acetil, a R^1 predstavlja

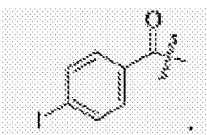


U još jednom slijedećem aspektu spoja formula (I) i (II), $r = 1$, $q = 2$, R^1 predstavlja acetil, R^4 i R^5 predstavljaju vodik, R^{14} predstavlja vodik, metil ili acetil, a R^{25} predstavlja



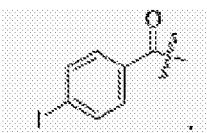
5

U još jednom slijedećem aspektu spoja formula (I) i (II), $r = 0$, R^4 i R^5 predstavljaju vodik, R^{14} predstavlja vodik, metil ili acetil, a R^1 predstavlja



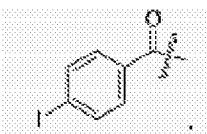
10

U još jednom slijedećem aspektu spoja formula (I) i (II), $r = 1$, $q = 2$, R^4 , R^5 i R^{25} predstavljaju vodik, R^{14} predstavlja vodik, metil ili acetil, a R^1 predstavlja



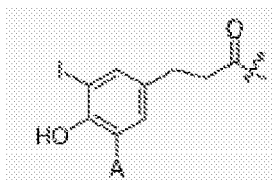
15

U još jednom slijedećem aspektu spoja formula (I) i (II), $r = 1$, $q = 2$, R^1 predstavlja acetil, R^4 i R^5 predstavljaju vodik, R^{14} predstavlja vodik, metil ili acetil, a R^{25} predstavlja



20

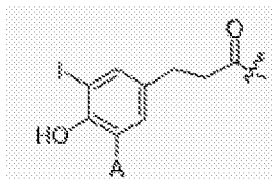
U još jednom slijedećem aspektu spoja formula (I) i (II), gdje $r = 0$, R^4 i R^5 predstavljaju vodik, R^{14} predstavlja vodik, metil ili acetil, a R^1 predstavlja



A predstavlja H ili I

U još jednom slijedećem aspektu spoja formula (I) i (II), gdje $r = 1$, $q = 2$, R^4 , R^5 i R^{25} predstavljaju vodik, R^{14} predstavlja vodik, metil ili acetil, a R^1 predstavlja

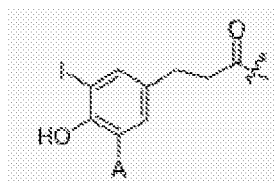
25



A predstavlja H ili I

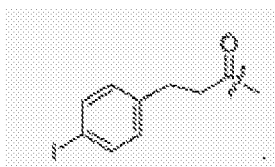
U još jednom slijedećem aspektu spoja formula (I) i (II), $r = 1$, $q = 2$, R^1 predstavlja acetil, R^4 i R^5 predstavljaju vodik, R^{14} predstavlja vodik, metil ili acetil, a R^{25} predstavlja

30

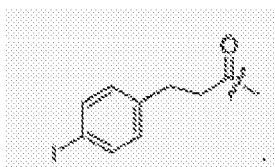


A predstavlja H ili I

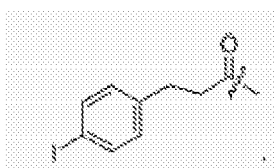
5 U još jednom slijedećem aspektu spoja formula (I) i (II), $r = 0$, R^4 i R^5 predstavljaju vodik, R^{14} predstavlja vodik, metil ili acetil, a R^1 predstavlja



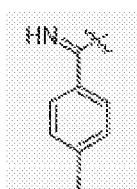
10 U još jednom slijedećem aspektu spoja formula (I) i (II), $r = 1$, $q = 2$, R^4 , R^5 i R^{25} predstavljaju vodik, R^{14} predstavlja vodik, metil ili acetil, a R^1 predstavlja



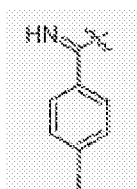
U još jednom slijedećem aspektu spoja formula (I) i (II), $r = 1$, $q = 2$, R^1 predstavlja acetil, R^4 i R^5 predstavljaju vodik, R^{14} predstavlja vodik, metil ili acetil i R^{25} predstavlja



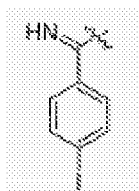
15 U još jednom slijedećem aspektu spoja formula (I) i (II), $r = 0$, R^4 i R^5 predstavljaju vodik, R^{14} predstavlja vodik, metil ili acetil, a R^1 predstavlja



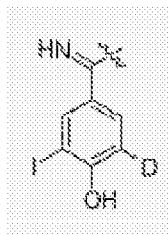
20 U još jednom slijedećem aspektu spoja formula (I) i (II), $r = 0$, R^4 i R^5 predstavljaju vodik, R^{14} predstavlja vodik, metil ili acetil, a R^1 predstavlja



U još jednom slijedećem aspektu spoja formula (I) i (II), $r = 1$, $q = 2$, R^4 , R^5 i R^{25} predstavljaju vodik, R^{14} predstavlja vodik, metil ili acetil, a R^1 predstavlja



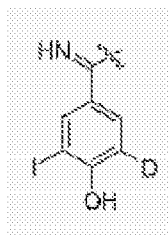
- 5 U još jednom slijedećem aspektu spoja formula (I) i (II), $r = 1$, $q = 2$, R^1 predstavlja acetil, R^4 i R^5 predstavljaju vodik, R^{14} predstavlja vodik, metil ili acetil, a R^{25} predstavlja



D = H ili I

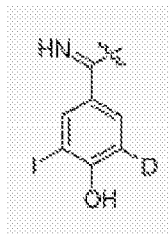
10

U još jednom slijedećem aspektu spoja formula (I) i (II), $r = 1$, $q = 2$, R^4 , R^5 i R^{25} predstavljaju vodik, R^{14} predstavlja vodik, metil ili acetil, a R^1 predstavlja



- 15 D = H ili I

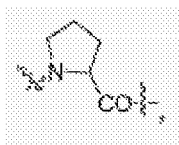
U još jednom slijedećem aspektu spoja formula (I) i (II), $r = 1$, $q = 2$, R^1 predstavlja acetil, R^4 i R^5 predstavljaju vodik, R^{14} predstavlja vodik, metil ili acetil, a R^{25} predstavlja



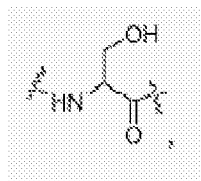
20

D = H ili I

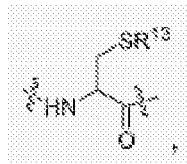
- 25 U prvom preferiranom aspektu, R^1 predstavlja acil ili supstituirani acil, R^2 predstavlja C_1 - C_4 alkil pri čemu je najmanje jedan atom vodika zamijenjen supstituentom odabranim iz grupe koja se sastoji od: $-NR^6R^7$, aril i supstituirani aril, pri čemu su R^6 i R^7 nezavisno odabrani iz grupe koja se sastoji od: vodik, acil i supstituirani acil, X_1 predstavlja $-NH(CH_2)_nCO-$, X_2 predstavlja



X_4 predstavlja

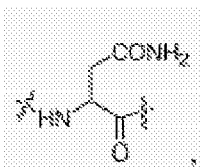


X₅ predstavlja



5 R¹³ predstavlja vodik, acil, supstituirani acil, alkil ili supstituirani alkil.

X₆ predstavlja

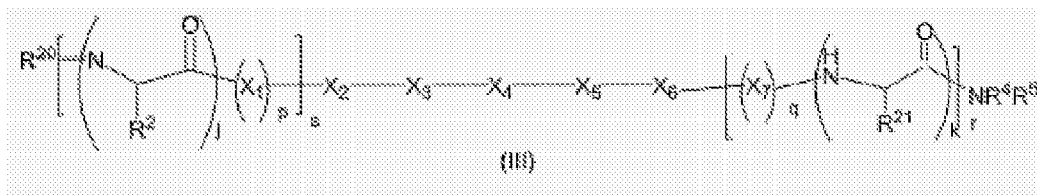


X₇ predstavlja -NH(CH₂)₆CO-, R³ predstavlja C₁-C₄ alkil pri čemu je najmanje jedan atom vodika zamijenjen supstituentom odabranim iz grupe koja se sastoji od: -NR¹⁵R¹⁶, aril i supstituirani aril, pri čemu su R¹⁵ i R¹⁶ nezavisno odabrani iz grupe koja se sastoji od: vodik, acil i supstituirani acil, a R⁴ i R⁵ predstavljaju vodik. U jednom aspektu, s predstavlja 0, a r predstavlja 1, k predstavlja 1, R predstavlja acetil, R¹³ predstavlja vodik, e predstavlja 1, a R³ predstavlja -(CH₂)₄NH₂. Preferira se da q predstavlja 2, 4 ili 6. U slijedećem aspektu, s predstavlja 0, a r predstavlja 1, k predstavlja 1, R¹ predstavlja acetil, R¹³ predstavlja vodik, e predstavlja 2, 4 ili 6, a R³ predstavlja -(CH₂)₄NHCO(CH₂)₂-Ph-(4-OH). Preferira se da q predstavlja 1. U još jednom slijedećem aspektu, s predstavlja 0, a r predstavlja 1, k predstavlja 1, R¹ predstavlja acetil, R¹³ predstavlja vodik, e predstavlja 2, 4 ili 6, a R³ predstavlja -CH₂-Ph-(4-OH). Preferira se da q predstavlja 1. U još jednom slijedećem aspektu, s predstavlja 0, a r predstavlja 1, k predstavlja 1, R¹ predstavlja acetil, R¹³ predstavlja metil, e predstavlja 1 a R³ predstavlja -(CH₂)₄NH₂. Preferira se da q predstavlja 2. U još jednom slijedećem aspektu, s predstavlja 1, a r predstavlja 0, j predstavlja 1, R¹ predstavlja acetil, R¹³ predstavlja vodik, h predstavlja 1, a R² predstavlja -CH₂-Ph-(4-OH). Preferira se da p predstavlja 2, 4 ili 6. U još jednom slijedećem aspektu, s predstavlja 1, a r predstavlja 0, j predstavlja 1, R¹ predstavlja acetil, R¹³ predstavlja vodik, h predstavlja 2, 4, ili 6, a R² predstavlja -CH₂-Ph-(4-OH). Preferira se da p predstavlja 1. U još jednom slijedećem aspektu, s predstavlja 1, a r predstavlja 0, j predstavlja 0, R¹ predstavlja -CO(CH₂)₂-Ph-(4-OH), R¹³ predstavlja vodik, a h predstavlja 1. Preferira se da p predstavlja 2, 4 ili 6. U još jednom slijedećem aspektu, s predstavlja 1, a r predstavlja 0, j predstavlja 0, R¹ predstavlja -CO(CH₂)₂-Ph-(4-OH), R¹³ predstavlja vodik, a h predstavlja 2, 4 ili 6. Preferira se da p predstavlja 1. U još jednom slijedećem aspektu, s predstavlja 0, a r predstavlja 0, R¹ predstavlja -(CH₂)₂-Ph-(4-OH) a R¹³ predstavlja vodik. U još jednom slijedećem aspektu, s predstavlja 0, a r predstavlja 0, R¹ predstavlja -COPh-(4-F), a R¹³ predstavlja vodik. U još jednom slijedećem aspektu, s predstavlja 0, a r predstavlja 1, k predstavlja 1, R¹ predstavlja acetil, R¹³ predstavlja metil ili vodik, e predstavlja 1, a R³ predstavlja -(CH₂)₄NHCOPh-(4-F). Preferira se da q predstavlja 2. U još jednom slijedećem aspektu, s predstavlja 0, a r predstavlja 1, k predstavlja 1, R¹ predstavlja acetil, R¹³ predstavlja vodik, e predstavlja 1, a R³ predstavlja -(CH₂)₄NH-8-[4'- fluorbenzilamino]suberoil ili -(CH₂)₄NHCOCH₂F. Preferira se da q predstavlja 2. U još jednom slijedećem aspektu, s predstavlja 1, a r predstavlja 0, j predstavlja 0, R¹ predstavlja 8-[4'- fluorbenzilamino]suberoil ili -COCH₂F, R¹³ predstavlja vodik, a h predstavlja 2. Preferira se da p predstavlja 1. U još jednom slijedećem aspektu, s predstavlja 0, a r predstavlja 1, k predstavlja 1, R¹ predstavlja acetil, R¹³ predstavlja vodik, a R³ predstavlja -CH₂Ph-(3-I, 4-OH) ili -CH₂Ph-(3,5-diI, 4-OH). Preferira se da q predstavlja 0. Preferira se da q predstavlja 1, a e predstavlja 2. Preferira se da q predstavlja 1, a e predstavlja 1. U još jednom slijedećem aspektu, s predstavlja 1, a r predstavlja 0, j predstavlja 1, R¹ predstavlja acetil, R¹³ predstavlja vodik, a R² predstavlja -CH₂Ph-(3-I, 4-OH) ili -CH₂Ph-(3,5-diI, 4-OH). Preferira se da p predstavlja 0. U još jednom slijedećem aspektu, s predstavlja 0, a r predstavlja 0, R¹ predstavlja -CO(CH₂)₂Ph (4-OH, 3,5 di-I), a R¹³ predstavlja vodik. U još jednom slijedećem aspektu, s predstavlja 1, a r predstavlja 0, j predstavlja 0, R¹ predstavlja -CO(CH₂)₂Ph (4-OH, 3,5 di-I), h predstavlja 2, a R¹³ predstavlja vodik. Preferira se da p predstavlja 1. U još jednom slijedećem aspektu, s predstavlja 1, a r predstavlja 0, j predstavlja 1, R¹ predstavlja acetil, R² predstavlja -CH₂-Ph(4-OH, 3, 5 di-I), h predstavlja 2, a R¹³ predstavlja vodik. Preferira se da p predstavlja 1. U još jednom slijedećem aspektu, s predstavlja 0, a r predstavlja 1, R³ predstavlja -(CH₂)₄NHCO(CH₂)₂-Ph (4-OH, 3, 5 di-I), e predstavlja 1, a R¹³ predstavlja vodik. Preferira se da q predstavlja 2.

U još jednom slijedećem aspektu, R¹ predstavlja acil kelat, R², R⁶, R⁷, X₁, X₂, X₄, X₅, R¹³, X₆, X₇, R³, R¹⁵, R¹⁶, R⁴ i R⁵ predstavljaju značenja kao što su definirana u prvom aspektu. U jednom aspektu, s predstavlja 1, a r predstavlja 0, j

predstavlja 0, R^1 predstavlja DOTA-In, h predstavlja 2, a R^{13} predstavlja vodik. Preferira se da p predstavlja 1. U slijedećem aspektu, s predstavlja 0, a r predstavlja 0, R predstavlja DPTA ili DPTA-In, a R^{13} predstavlja vodik.

U slijedećem aspektu, ovaj izum pruža spoj formule (III):



ili njegovu farmaceutski prihvatljivu sol, solvat, hidrat ili N-oksidi pri čemu

R^{20} predstavlja acil, supstituirani acil, alkil, supstituirani alkil, cikloalkil, supstituirani cikloalkil, imino, supstituirani imino ili dijagnostičko sredstvo;

R^{21} predstavlja C_1 - C_6 alkil pri čemu je najmanje jedan atom vodika zamijenjen supstituentom odabranim iz grupe koja se sastoji od $-NHR^{22}$;

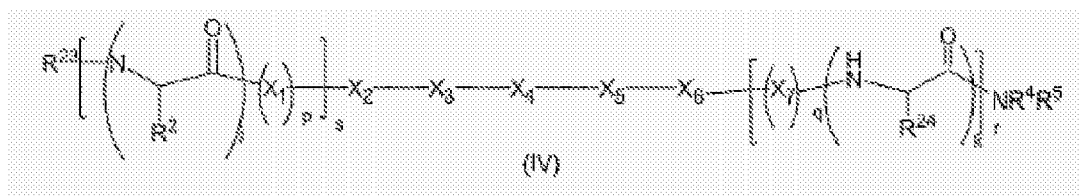
R^{22} predstavlja vodik, acil, supstituirani acil, alkil, supstituirani alkil ili dijagnostičko sredstvo; a

j, k, p, q, r, s, R^2 , X_1 , X_2 , X_3 , X_4 , X_5 , X_6 , X_7 , R^4 i R^5 predstavljaju značenja kako su definirana u strukturnoj formuli (I);

uz uvjet da najmanje jedan od R^{20} i R^{22} predstavlja dijagnostičko sredstvo.

U jednom aspektu, R^2 , X_1 , X_2 , X_3 , X_4 , X_5 , X_6 , X_7 , R^4 i R^5 predstavljaju značenja kako su definirana u prvom preferiranom aspektu. U jednom aspektu, R^{20} predstavlja fluorescentno sredstvo. Preferira se da R^{20} predstavlja 5/6 karboksi fluorescein, s predstavlja 1, r predstavlja 0, j predstavlja 0, e predstavlja 2, a p predstavlja 1. U slijedećem aspektu, R^{22} predstavlja fluorescentno sredstvo. Preferira se da R^{21} predstavlja $(CH_2)_4NH$ -, R^{22} predstavlja -5/6 karboksi fluorescein, s predstavlja 0, r predstavlja 1, k predstavlja 1, e predstavlja 1, a q predstavlja 2. Preferira se da R^{21} predstavlja $(CH_2)_4NH$ -, R^{22} predstavlja biotin, s predstavlja 0, r predstavlja 1, k predstavlja 1, e predstavlja 1, a q predstavlja 2.

U slijedećem aspektu, ovaj izum pruža spoj formule (IV):



ili njegovu farmaceutski prihvatljivu sol, solvat, hidrat ili N-oksidi pri čemu:

R^{23} predstavlja acil, supstituirani acil, alkil, supstituirani alkil, cikloalkil, supstituirani cikloalkil, imino, supstituirani imino ili pegilirajuće sredstvo;

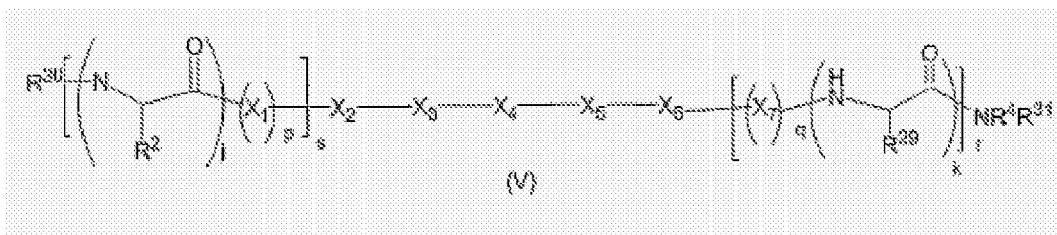
R^{24} predstavlja C_1 - C_6 alkil pri čemu je najmanje jedan atom vodika zamijenjen supstituentom odabranim iz grupe koja se sastoji od $-NHR^{28}$ pri čemu R^{28} predstavlja vodik, acil, supstituirani acil, alkilom supstituirani alkil ili pegilirajuće sredstvo; a

j, k, p, q, r, s, R^2 , X_1 , X_2 , X_3 , X_4 , X_5 , X_6 , X_7 , R^4 i R^5 predstavljaju značenja kako su definirana u strukturnoj formuli (I);

uz uvjet da najmanje jedan od R^{23} ili R^{28} predstavlja pegilirajuće sredstvo.

U jednom aspektu, R^2 , X_1 , X_2 , X_3 , X_4 , X_5 , X_6 , X_7 , R^4 i R^5 predstavljaju značenja kako su definirana u prvom preferiranom aspektu. Preferira se da R^{23} predstavlja m-PEG, s predstavlja 1, r predstavlja 0, j predstavlja 0, h predstavlja 2, a p predstavlja 1.

U još jednom slijedećem aspektu, ovaj izum pruža spoj formule (V):



ili njegovu farmaceutski prihvatljivu sol, solvat, hidrat ili N-oksidi pri čemu:

R^{29} predstavlja C_1 - C_6 alkil pri čemu je najmanje jedan atom vodika zamijenjen s $-NHR^{32}$;

R^{30} predstavlja acil, supstituirani acil, alkil, supstituirani alkil ili terapijsko sredstvo.

R^{31} predstavlja vodik, alkil, supstituirani alkil ili terapijsko sredstvo;

R^{32} predstavlja vodik, acilom supstituirani acil, alkil, supstituirani alkil ili terapijsko sredstvo; a;

j, k, p, q, r, s, R^2 , X_1 , X_2 , X_3 , X_4 , X_5 , X_6 , X_7 te R^4 i R^5 predstavljaju značenja kako su definirana u strukturnoj formuli(I);

uz uvjet da najmanje jedan među R^{30} , R^{31} i R^{32} predstavlja terapijsko sredstvo.

U jednom aspektu, R^2 , X_1 , X_2 , X_3 , X_4 , X_5 , X_6 , X_7 te R^4 predstavljaju značenja kako su definirana u prvom preferiranom aspektu. Preferira se da R^{13} predstavlja metil ili acetil, s predstavlja 0, r predstavlja 0, R^{30} predstavlja acetil, a R^{31} predstavlja terapijsko sredstvo. U jednom aspektu, terapijsko sredstvo predstavlja doksorubicin. U sljedećem aspektu, R^{13} predstavlja metil ili vodik, s predstavlja 0, r predstavlja 1, k predstavlja 1, c predstavlja 1, q predstavlja 2, R^{30} predstavlja acetil, R^{31} predstavlja vodik, R^{29} predstavlja $-(CH_2)_4NHR^{32}$. Preferira se da R^{32} predstavlja $-CO(CH_2)_3$ -doksorubicin ili protoporfirin.

U ovom se izumu posebno razmatra korištenje sintetskih aminokiselina. U skladu s time izum uključuje varijacije spojeva, na primjer, D-amino kiseline prirodnih aminokiselina, (3-alanin, 3-aminopropionska kiselina, 2,3 diamino propionska kiselina, 4-aminobutanska kiselina, itd., sarkozin, ortinin, N-metil glicin, citrulin, t-butil alanin, homoarginin, itd. se nalaze unutar područja ovog izuma.

Jedna ili amidne veze u spojevima izuma mogu biti opcionalno zamijenjene izosterima kao što su $-CH_2-NH-$, $-CH_2-S-$, $-CH_2-S(O)-$, $-CH_2-S(O)_2-$, $-COCH_2-CH=CH-$, $CH(OH)CH_2$ koji su dobro poznati u struci (pogledaj, na primjer, Spatola, "Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins," B. Weinstein, (eds.), Marcel Dekker, New York, 1983; Spatola *et al.*, *Life Sci.* 1986,38 : 1243-1249; Almkvist *et al.*, *J. Med. Chem.* **1980**,23 : 1392; Holladay *et al.*, *Tetrahedron Lett.* **1983**,24 : 4401; Hruby, *Life Sci.* 1982,4; 189: 199; Jennings-White *et al.*, *Tetrahedron Lett.* **1982**,23 : 2533; Hruby, *Biopolymers* **1993**; 33: 1073-1082; Wiley *et al.*, *Med. Res. Rev.* **1993** 13 : 327-384; Moore *et al.*, *Adv. in Pharmacol* **1995**, 33:91-141; Giannis *et al.*, **1997**, *Adv. in Drug Res.* 29 : 1-78). Peptidi izuma mogu također sadržavati peptidne mimetike kao što su oni opisani kod Olson *et al.*, *J. Med. Chem.* **1993**,36 :3039 i Chorev *et al.*, *Science* **1979**,204 : 1210.

Kovalentne modifikacije spojeva izuma su unutar područja ovog izuma te mogu poboljšati topivost, apsorpciju, biološko vrijeme poluraspada, itd. Takve se modifikacije mogu izvršiti pomoću selektivne reakcije specifičnih ostataka amino kiseline s organskim reagensima. Na primjer, histidinski ostaci mogu biti selektivno reagirani s dietilpirokarbonatom pri vrijednosti pH od 5.5-7 i s *p*-bromfenacil bromidom pri vrijednosti pH od 6.0. Ostaci koji sadrže slobodne amino grupe mogu biti selektivno reagirani s anhidridima karboksilnih kiselina, imidoesterima, piridoksal fosfatom, trinitrobenzensulfonskom kiselinom, O-metilizoureom, 2,4 pentandionom, glioksilatom, itd. Arginil ostaci mogu biti selektivno reagirani s fenilgliksalom, i raznim dionima. Glutaminil i asparaginil ostaci mogu biti deaminirani pod blago kiselim uvjetima kako bi se osigurali odgovarajući glutamil i aspartil ostaci. Prolin i lizin mogu biti selektivno hidroksilirani dok serinski i treoninski ostaci mogu biti selektivno fosforilirani. Histidinske i lizinske α -amino grupe mogu biti selektivno metilirane (Creighton, *Proteins: Structure i Molecule Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)).

Derivatizacija s bi-funkcionalnim sredstvima za unakrsno povezivanje (na primjer, 1-bis(diazoacetil)-2-feniletan, glutaraldehid, esterima N-hidroksi-sukcinimida, esterima 4-azidosalicilne kiseline, homobifunkcionalnim imidoesterima (na primjer, disukcinimidil esteri kao što su 3,3'-ditiobis(sukcinimidilpropionat)), bifunkcionalnim maleimidima (na primjer, bis-N-maleimido-1,8-oktan, itd.) se može koristiti za vezanje spojeva s u vodi netopivim nosivim matricama ili s drugim makromolekularnim nosivim tvarima. Fotoaktivirajuća sredstva kao što su metil-3-[(*p*-azidofenil)ditio] propioimidat se mogu također koristiti za vezanje spojeva s u vodi netopivim nosivim matricama. Alternativno, spojevi

se mogu izravno reagirati s reaktivnim u vodi netopivim matricama (na primjer, cijanogen bromidom aktivirani ugljikohidrati).

Ovaj izum također uključuje duže peptide sastavljene od ponavljajućih jedinica sekvenca amino kiselina spojeva izuma. U jednom aspektu, ponavljajuća jedinica takvog multimeru predstavlja amino kiselinsku sekvencu spoja u kojem a, b, x, y i z predstavljaju 1. U slijedećem aspektu, ponavljajuća jedinica predstavlja amino kiselinsku sekvencu spoja izuma u kojem samo jedan od a, b, x, y i z predstavlja 0, a ostali predstavljaju 1.

Multimer može biti sastavljen bilo od istih bilo od različitih kombinacija ponavljajuće jedinice sastavljene od amino kiselinskih sekvenca spojeva strukturne formule (I). Takvi multimerni peptidi mogu se izraditi bilo pomoću kemijskih sinteza bilo pomoću tehnika rekombinantne DNA, nakon čega slijedi kemijska modifikacija cistinskih ostataka. Preferira se da sintetski multimeri imaju dva do 12 ponavljanja, više se preferira da imaju dva do osam ponavljanja jezgre peptidne sekvence. U skladu s time, ukupni broj amino kiselina u multimeru ne bi trebao prijeći približno 110 ostataka (ili ekvivalenata, kada uključuje linkere ili "spacer-e").

Preferirani multimer ima formulu P^1n u kojoj P^1 predstavlja pentapeptid, n predstavlja dva do osam. U slijedećem aspektu, multimer ima formulu $(P^1-X_m)_n-P^2$ u kojoj P^1 i P^2 predstavljaju pentapeptide. P^1 i P^2 mogu biti isti ili različiti te svaki P^1 može predstavljati različiti derivat pentapeptida strukturne formule (I). X predstavlja C_1-C_5 alkil, C_1-C_5 polijeter koji sadrži do 4 kisikova atoma ili Gly_z pri čemu $z = 1-6$, $m = 0$ ili 1, a $n = 1-7$.

Preferirani rekombinantno proizvedeni peptidni multimer ima formulu $(P^1-Gly_z)_n-P^2$ gdje P^1 i P^2 predstavljaju pentapeptide koji su isti ili različiti, a svaki P^1 u multimeru može biti različiti pentapeptid, $n = 1-100$, a $z = 0-6$. Multimer može biti opcionalno funkcionaliziran i na N-terminusu i na C-terminusu.

Spojevi izuma mogu biti modificirani pomoću kovalentnog vezanja bilo kojeg tipa molekule sve dok modifikacija ne sprječava ili inhibira biološko djelovanje (drugim riječima, inhibiranje ili sprječavanje angiogeneze, invazija stanica, proliferacija stanica, itd.). Na primjer, spoj izuma može biti modificiran pomoću glikozilacije, acetilacije, pegilacije, fosforilacije, amidacije, proteolitičkog cijepanja, vezanja za stanični ligand ili protein, itd. Preferira se da su spojevi izuma konjugirani za terapijsko sredstvo ili dijagnostičko sredstvo bilo izravno ili preko dijela za povezivanje.

Preferira se da je dio za povezivanje prvo vezan za dijagnostičko ili terapijsko sredstvo kako bi oblikovali intermedijer dijela za povezivanje koji se zatim nadalje veže za spoj strukturne formule (I). Kao što će biti očito iskusnom stručnjaku, dio za povezivanje može također biti prvo vezan za spoj izuma kako bi oblikovali intermedijer dijela za povezivanje koji može tada biti vezan za dijagnostičko sredstvo ili terapijsko sredstvo.

Tipično, dio za povezivanje će uključivati linker i grupu za povezivanje kojom se konjugira terapijsko sredstvo ili dijagnostičko sredstvo za peptid. Priroda linkera će zavisiti od određene primjene i tipa željene konjugacije pošto linker može biti hidrofilni ili hidrofobni, dugi ili kratki, krut ili fleksibilan. Linker može biti opcionalno supstituiran s jednom ili više grupa za povezivanje koje mogu biti bilo iste bilo različite, koje u skladu s time pružaju polivalentne dijelove za vezanje koji su sposobni konjugirati višestruka terapijska sredstva ili dijagnostička sredstva s antitijelom.

U struci je poznat široki izbor linkera sastavljenih od stabilnih veza prikladnih za razdvajanje grupa za povezivanje od amino nitro spoja, te uključuju primjerice, a ne kao ograničenje, alkil, heteroalkil, acikličke heteroatomske mostove, aril, arilalkil, heteroaril, heteroaril-heteroaril, supstituirani heteroaril-heteroaril, heteroarilalkil, heteroaril-heteroalkil i slično. Tako linker može uključivati jednostruke, dvostruke, trostruke ili aromatske ugljik-ugljik veze, dušik-dušik veze, ugljik-dušik, ugljik-kisik veze i/ili ugljik-sumpor veze. U skladu s time, funkcionalne skupine kao što su karbonili, eteri, tioeteri, karboksamidi, sulfonamidi, uree, uretani, hidrazini, itd. mogu biti uključene u linkeru.

Odabir prikladnog linkera se nalazi unutar sposobnosti iskusnih stručnjaka. Na primjer, gdje se želi kruti linker, linker može biti kruti polinezasićeni alkil ili aril, biaril, heteroaril, itd. Gdje se želi fleksibilni linker, linker može biti fleksibilni peptid kao što su Gly-Gly-Gly ili fleksibilni zasićeni alkanil ili heteroalkanil. Hidrofilni linkeri mogu biti, na primjer, polialkoholi ili polijeteri kao što su polialkilenglikoli. Hidrofobni linkeri mogu biti, na primjer, alkili ili arili.

Preferira se da je grupa za vezanje sposobna da posreduje kod stvaranja kovalentne veze s komplementarnom reaktivnom funkcionalnom skupinom, na primjer, peptida kako bi pružili terapijsko sredstvo ili dijagnostičko sredstvo konjugirano za peptid. U skladu s time, grupa za vezanje može biti bilo koja reaktivna funkcionalna skupina poznata iskusnim stručnjacima koja će reagirati s uobičajenim kemijskim grupama koje se nalaze u peptidima (na primjer, amino, sulfhidril, hidroksil, karboksilat, imidizaloil, gvandinij, amid, itd.). U skladu s time, grupa za vezanje može biti, na primjer, fotokemijski aktivirana grupa, elektrokemijski aktivirana grupa, donor slobodnog radikala, akceptor slobodnog radikala, nukleofilna grupa ili elektrofilna grupa.

Ipak, iskusni stručnjaci će prepoznati da mnoštvo funkcionalnih grupa koje su tipično nereaktivne pod određenim reakcijskim uvjetima mogu biti aktivirane da postanu reaktivne. Grupe koje mogu biti aktivirane da postanu reaktivne uključuju, na primjer, alkohole, karboksilne kiseline i estere, uključujući njihove soli.

- 5 Grupa za vezanje može biti $-NHR^1$, $-NH_2$, $-OH$, $-SH$, halogen, $-CHO$, $-R^1CO$, $-SO_2H$, $-PO_2H$, $-N_3$, $-CN$, $-CO_2H$, $-SO_3H$, $-PO_3H$, $-PO_2(O R^1)H$, $-CO_2R^1$, $-SO_3R^1$ ili $-PO(OR^1)_2$ gdje R^1 predstavlja alkil. Preferira se da grupa za vezanje predstavlja $-NHR^1$, $-NH_2$, $-OH$, $-SH$, $-CHO$, $-CO_2H$, R^1CO , halogen i $-CO_2R^1$.
- 10 Neki aspekti linkera i grupe za vezanje uključuju, na primjer, spojeve gdje linker predstavlja $-(CH_2)_n$, pri čemu n predstavlja cijeli broj između 1 i 8, grupa za vezanje predstavlja $-NH_2$, $-OH$, $-CO_2H$, i $-CO_2R^1$ te odgovarajuće analoge gdje je bilo koji prikladni vodik supstituiran. Drugi aspekti dijela za povezivanje uključuju bilo koju amino kiselinu, koja može biti, na primjer, D ili L amino kiselina. Tako dio za povezivanje može biti dipeptid, tripeptid ili tetrapeptid sastavljen od bilo koje kombinacije amino kiselina. Polarnost peptidne veze kod tih peptida može biti bilo C-N bilo N-
- 15 C.

Terapeutska sredstva i dijagnostička sredstva mogu biti vezana za peptide izravno korištenjem mnoštva konvencionalnih reakcija poznatih iskusnom stručnjaku. Na primjer, kondenzacijski reagensi (na primjer, karbodiimid, karbonildiimidazoli, itd.) se mogu koristiti za stvaranje amidne veze između amino grupe terapeutskog ili dijagnostičkog sredstva i karboksilno kiselinske grupe ostataka kao što su glutamska kiselina, aspartamska kiselina i C-terminalna karboksilna grupa spoja strukturne formule (I).

Slične se metode mogu koristiti za vezanje terapeutskih sredstava i dijagnostičkih sredstava koja sadrže linker i grupu za vezanje za spojeve strukturne formule (I). Na primjer, dijagnostička sredstva i terapeutska sredstva koja sadrže linker i grupu za vezanje mogu biti vezana za amino grupu lizina, karboksilno kiselinske grupe glutamske kiseline i aspartamske kiseline, sulfhidril grupu cisteina, hidroksil grupe treonina i serina te razne dijelove aromatskih amino kiselina peptida korištenjem konvencionalnih pristupa poznatih iskusnom stručnjaku. Općenito, odabir prikladne strategije za konjugiranje dijagnostičkih sredstava ili terapeutskih sredstava za peptid bilo izravno bilo kroz linker i grupu za vezanje je unutar područja iskusnog stručnjaka.

Terapeutska sredstva koja se mogu konjugirati za peptide uključuju, ali na taj način da nisu time ograničena, radionuklide, porfirine i derivate porfiringa za fotodinamičku terapiju (na primjer, protoporfirin, benzoporfirinski derivat monokiseline A, kositar-etio purpurin, meta-tetrahidroksifenilklorin, HPD, fotofrin, protoporfirin IX, Pc4, mono aspartil klorin e_6 , za ostale pogledaj T. Hassan *et al.*, "PhotoDinamic Therapy of cancer" u: Cancer medicine, fifth edition, R. C. Blast *et al.*, Ed. , B. C. Decker Inc, Canada, 2000, p. 489-502), proteinske toksine (na primjer, ricin, *Pseudomonas* egzotoksin, toksin difterije, saporin, antivirusni protein vinobojke, buganin, itd.), citotoksična sredstva za rak, kamptotecini (na primjer, 9-nitrokamptotecin (9NC), 9-aminokamptotecin (9AC), 10-aminokamptotecin, 9-klorkamptotecin, 10,11-metilendioksikamptotecin, irinotecin, esteri aromatskih kamptotecina, esteri alkil kamptotecina, topotekan, metansulfonat dihidrat (1S,9S)-1-amino-9-etil-5-fluor-2,3-dihidro-9-hidroksi-4-metil-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7] indolizino[1,2-b]kinolin-10,13(9H,15H)-diona (DX-8951f), 7-[(2-trimetil-silil)etil]20(S)kamptotecin (BNP1350), rubitekan, eksatekan, lurtotekan, diflomotekan i drugi homokamptotecini, itd), taksani, (na primjer taksol), epitoloni, kaliheamicini, hidroksi uree, citarabin, ciklofosamid, ifosamid, nitrozuree, cisplatin, mitomicini majtanzini, karboplatin, dekarbazin, prokarbazin, etopozidi, tenopozidi, bleomicin, doksurobicin, 2-pirolinodoksurobicin, daunomicin, idarubikan, daunorubicin, daktinomicin, plikamicin, mitoksantron, asparaginaza, dihidroksi antracin dion, mitrimicin, aktinomicin D, 1-dehidrotestosteron, citoklasini, vinblastin, vinkristin, vinoreblin, paklitaksel, docetaksel, gramicidin D, glukokortikoidi, antraciklini, prokain, terakain, lidokain, propanolol, puomicin, metotreksat, 6-merkaptopurin, 6-tiogvanin, mustard toksini, antirimicin, paklitaksel, alkilirajuća sredstva (na primjer mehoremetamin, tioepa klorambucil, melfalan, karmustin, loustin, ciklotosfamid, busulfan, dibrommanitol, streptozotocin, itd), njihove homologe i analoge. Preferira se da terapeutsko sredstvo predstavlja citotoksično sredstvo za rak, kao što je na primjer taksan, kamptotecin, epitilon ili antraciklin. U jednom aspektu terapeutsko sredstvo je doksorubicin. U slijedećem aspektu terapeutsko sredstvo je radionuklid.

Također unutar raspona ovog izuma nalazi se konjugacija spojeva s raznim pegilirajućim sredstvima. Reprezentativna pegilirajuća sredstva uključuju, ali na taj način da nisu time ograničena, a-metoksi-w-karboksi-PEG 2K & 5K1, a-metoksi-w-N-sukcinimidilglutarat-PEG 2K & 5K1, a-metoksi-w-glutarat-PEG 2K, 5K, 20K, 30K2, a-metoksi-w-GGGglutarat-PEG 2K & 5K1, mPEG-sukcinimidil propionat 2K, 5K, 20K, 30K2 i m-PEG-ButirALD 2K, 5K, 20K, 30K2 (za ostala pegilirajuća sredstva pogledaj Li *et al.*, *Biomacromolecules*, **2003**, 4, 1055.1067). Uobičajena pegilirajuća sredstva su također dostupna od strane komercijalnih izvora kao što su Nektar Therapeutics, San Carlos, CA. Metode za vezanje raznih PEG grupa za peptide su brojne i dobro su poznate iskusnom stručnjaku.

Pojam "dijagnostički označen" označuje da peptid ima vezan dijagnostički detektabilni označivač. Postoje u struci mnogi različiti označivači i metode označavanja su dobro poznate iskusnom stručnjaku. Općeniti razredi označivača,

koji se mogu koristiti u ovom izumu, uključuju, ali na taj način da nisu time ograničeni, radioaktivne izotope, paramagnetične izotope, spojeve koji mogu biti prikazani pomoću pozitronske emisijske tomografije (PET), fluorescentne ili obojane spojeve, spojeve koji mogu biti prikazani pomoću magnetske rezonance, kemiluminiscentne spojeve, bioluminiscentne spojeve, itd. Prikadni detektabilni označivači uključuju, ali na taj način da nisu time ograničeni, radioaktivne, fluorescentne, fluorogene ili kromogene označivače. Korisni radiooznačivači (radionuklidi), koji se detektiraju jednostavno pomoću gama brojača, scintilacijskog brojača ili autoradiografije uključuju, ali na taj način da nisu time ograničeni, ^3H , ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S i ^{14}C .

Metode i mješavine za kompleksiranje metala za peptide su dobro poznate u struci. Metali su, preferira se, detektabilni metalni atomi, uključujući radionuklide, a kompleksirani su za proteine i druge molekule (pogledaj, na primjer, U. S. Patent Nos. 5,627,286, 5,618,513, 5,567,408, 5,443,816 i 5,561,220).

Uobičajeni fluorescentni označivači uključuju, ali na taj način da nisu time ograničeni, fluorescein, rodamin, danzil, fikoeritrin, fikocijanin, alofikocijanin, *o*-ftaldehid i fluorescamin (Haugland, *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, Sixth Ed., Molecular Probes, Eugene, OR, 1996) mogu se koristiti za označivanje spojeva strukturne formule (I). Fluorescein, derivati fluoresceina i fluoresceinu slične molekule kao što su Oregon Green i njegovi derivati, Rhodamin Green i Rhodol Green, se spajaju na aminske grupe korištenjem izotiocijanata, suksinimidil estera ili diklortriazinil reaktivne grupe. Slično tome, fluorofori se mogu također spojiti za tiole korištenjem maleimida, jodacetamida, te aziridin reaktivne grupe. Rodamini duge valne duljine, koji su u osnovi derivati Rhodamine Green-a sa supstituentima na dušikovim atomima, se preferiraju kao reagensi za označavanje. Ta grupa uključuje tetrametilrodamin, X-rodamin i derivate Texas Red-a. Ostali fluorofori su oni koji ekscitiraju izloženi ultraljubičastom svjetlu. Primjeri uključuju, ali na taj način da nisu time ograničeni, "cascade blue", derivate kummarina, naftalene (kojih je član danzil klorid), pirene i derivate piridiloksazola.

Anorganski materijali kao što su poluvodiči nanokristali (Bruchez, *et al.*, **1998**, *Science* 281: 2013-2016) i kvantni biljezi, na primjer, cinkovim sulfidom zaštićeni Cd selenid (Chan, *et al.*, *Science* **1998**, 281 : 2016-2018) mogu se također koristiti kao dijagnostički označivači.

Peptidi se mogu također označiti s metalima koji emitiraju fluorescentno kao što je ^{112}Eu ili drugi iz niza lantanida. Ti metali mogu biti vezani za spojeve strukturne formule (I) kroz acil kelatirajuće grupe kao što su dietilentriaminopentaocetna kiselina (DTPA), etilen-diamino-tetraocetna kiselina (EDTA), itd..

Radionuklidi mogu biti vezani za peptide bilo izravno bilo neizravno korištenjem acil kelatirajućih grupa kao što su DTPA i EDTA za *in vivo* dijagnozu. Kemija kelatiranja je dobro poznata u struci te se mogu koristiti različiti nizovi kelatirajućeg sredstva za peptid kako bi se priskrbio označeni peptid. Svakako da označeni peptid mora zadržati biološko djelovanje izvornog peptida.

Svaki se radionuklid koji ima dijagnostičku ili terapijsku vrijednost može koristiti kao radiooznačivač u ovom izumu. U preferiranom aspektu, radionuklid predstavlja γ -emitirajući ili beta-emitirajući radionuklid, na primjer, odabran u periodnom sustavu elemenata iz niza lantanida ili aktinida. Pozitron-emitirajući radionuklidi, na primjer ^{68}Ga ili ^{64}Cu , se mogu također koristiti. Prikadni gama-emitirajući radionuklidi uključuju one koji su korisni kod primjena dijagnostičkih prikaza ("imaging"). Gama-emitirajući radionuklidi, preferira se, imaju vrijeme polu-raspada od 1 sat do 40 dana, preferira se od 12 sati do 3 dana. Primjeri prikladnih gama-emitirajućih radionuklida uključuju ^{67}Ga , ^{111}In , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{169}Yb i ^{186}Re . Najviše se preferira radionuklid $^{99\text{m}}\text{Tc}$.

Primjere preferiranih radionuklida (poredanih po atomskom broju) predstavljaju ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{72}As , ^{89}Zr , ^{90}Y , ^{97}Ru , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{123}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{169}Yb , ^{186}Re , i ^{201}Tl . Premda je s pozitron-emitirajućim radiometalima kao označivačima bilo rađeno ograničeno, određeni proteini, kao što su transferin i humani serumski albumin, su bili označeni s ^{68}Ga .

Brojni metali (ne radioizotopi) korisni za prikaz magnetskom rezonancijom (MRI) uključuju gadolinij, mangan, bakar, željezo, zlato i europij. Gadolinij se najviše preferira. Općenito, količina označenog peptida potrebna za mogućnost detektiranja kod dijagnostičke upotrebe će varirati zavisno od uvjeta kao što su starost, stanje, spol, i raspon bolesti kod pacijenta, kontraindikacija, ako ih ima, i drugih varijabla, te se treba podesiti od strane pojedinog liječnika ili dijagnostičara. Doziranje može varirati od 0.01 mg/kg do 100 mg/kg.

Peptidi se mogu također detektirati pomoću vezanja za fosforescentni ili kemiluminiscentni spoj, kao što je dobro poznato iskusnom stručnjaku. Preferirani kemiluminiscentni spojevi uključuju, ali na taj način da nisu time ograničeni, luminol, izoluminol, teromatski akridinij ester, imidazol, akridinij sol i oksalatni ester. Slično tome, bioluminiscentni se spojevi mogu koristiti za detektiranje antitijela i/ili njihovih konjugata te uključuju, ali na taj način da nisu time ograničeni, luciferin, luciferazu i ekvorin ("aequorin").

Kolorimetrička detekcija, zasnovana na kromogeničnim spojevima koji imaju, ili rezultiraju, kromoforima s visokim koeficijentima ekstinkcije se može također koristiti za detekciju spojeva strukturne formule (I).

Sinteza

Spojevi izuma se mogu dobiti pomoću konvencionalnih metoda sinteze. Početni materijali korisni za pripravljanje spojeva izuma i njihovi intermedijeri su komercijalno dostupni na tržištu ili se mogu pripremiti pomoću dobro poznatih metoda sinteze.

Peptidi se mogu pripremiti korištenjem sinteze krute faze kao što je ona općenito opisana od strane Merrifield, *J. Amer. Chem. Soc.* **1963**, 85 : 2149-54 korištenjem automatizirane opreme, koja se može nabaviti od dobavljača kemikalija i kemijske opreme (na primjer, Applied Biosystems, Foster City, CA), ili neautomatizirane opreme. Sinteza krute faze peptida može biti započeta sa C-terminusa peptida pomoću vezanja zaštićene α -amino kiseline (bilo Boc bilo FMOC zaštićene), za prikladnu smolu. Takav početni materijal se može pripremiti pričvršćivanjem α -amino-zaštićene amino kiseline pomoću esterske veze za klormetiliranu smolu, hidroksimetil smolu, BHA smolu, MBHA smolu ili Rink smolu. Takve metode, dobro poznate u struci, su objavljene, na primjer, u United States Patent No. 5,994,309. Alternativno, spojevi izuma se mogu izraditi pomoću sinteze otopljene faze korištenjem zaštićenih α -amino kiselina (pogledaj na primjer, Bodanszky, "Methods of Peptide Synthesis," Springer Verlag, New York, 1984). Kao što je očito iskusnim stručnjacima, sintetske amino kiseline se mogu lako uključiti u gornje standardne metode kemijske sinteze te se mogu izraditi pomoću konvencionalnih metoda poznatih iskusnim stručnjacima.

Iskusni će stručnjak poštovati da za sintetiziranje spojeva izuma postoje dvije opće strategije sinteze. Spojevi s amino kiselinama koje sadrže sumpor se mogu sintetizirati bilo izravno bilo pomoću ugrađivanja odgovarajuće amino kiseline koja sadrži sumpor u standardnu metodu kemijske sinteze kao što je opisano gore ili neizravno pomoću selektivne funkcionalizacije odgovarajućeg tiola koji sadrži peptidni prekursor te, ako je neophodno, selektivnom oksidacijom rezultirajućeg tioetera koji sadrži peptid. Metode za selektivno funkcionaliziranje slobodnih tiola (na primjer, selektivna alkilacija, acilacija, stvaranje disulfida, itd.) u prisustvu različitih organskih funkcionalnih skupina su dobro poznate iskusnom stručnjaku kao što su i metode oksidiranja sulfida do sulfoksida (na primjer, NaBO₃, acetonitril: voda, NaIO₄, acetonitril: voda, itd.) i sulfona (na primjer, H₂O₂, HCO₂H).

Analize za spojeve izuma

Iskusni stručnjaci će poštovati da *in vitro* i *in vivo* analize korisne za mjerenje djelovanja spojeva izuma, a koje su opisane ovdje, nisu opsežne i sveobuhvatne nego prije služe kao objašnjenje.

Analiza migracije endotelne stanice

Za migraciju endotelne stanice (EC), transjažice su presvućene s kolagenom tipa I (50 μ g/mL) dodavanjem 200 μ L otopine kolagena po transjažici, zatim inkubiranjem preko noći pri temperaturi od 37°C. Transjažice su sakupljene u posudi s 24 jažice te je dodan kemoatraktant (na primjer, FGF-2) u donju komoru u ukupnom volumenu od 0.8 mL medija. Endotelne stanice, kao što su endotelne stanice humane umbilikalne vene (HUVEC), koje su bile odvojene iz jednoslojne kulture korištenjem tripsina, su razrijeđene do konačne koncentracije od približno 10⁶ stanica/mL s medijem bez seruma, a 0.2 mL te stanične suspenzije je dodano u gornju komoru svake transjažice. Inhibitori koji se trebaju ispitati mogu se dodati i u gornju i u donju komoru, te se pusti nastavak migracije kroz 5 sati u ovlaženoj atmosferi pri temperaturi od 37°C. Transjažice se uklanjaju iz posude koja je obojana korištenjem DiffQuik®. Stanice koji nisu migrirale se uklanjaju iz gornje komore struganjem vatom na štapiću, a membrane su odvojene, postavljene na predmetna stakalca, i izbrojane pod visokosnažnim poljem (400x) kako bi se odredio broj migriranih stanica.

Biološka analiza protuinvazivnog djelovanja

Sposobnost stanica kao što su endotelne stanice ili tumorske stanice (na primjer, PC-3 humanog raka prostate) da prodru (invadiraju) kroz rekonstituiranu osnovnu membranu (Matrigel®) u analizi poznatoj kao sustav Matrigel® analize invazije je bila opisana detaljno u struci (Kleinman *et al.*, *Biochemistry* **1986**, 25 :312-318; Parish *et al.*, **1992**, *Int. J. Cancer*

52:378-383). Matrigel® predstavlja rekonstituiranu osnovnu membranu koja sadrži kolagen tip IV, laminin, heparan sulfat proteoglikane kao što su perlekan, koji se veže za i lokalizira bFGF, vitronektin kao i transformirajući faktor rasta- β (TGF β), urokinazni aktivator plazminogena (uPA), aktivator tkivnog plazminogena (tPA) i serpin poznat kao inhibitor tipa 1 aktivatora plazminogena (PAI-1) (Komors *et al.*, *Canc. Res.* **1995**,55:1578-1585). Prihvaćeno je u struci da rezultati dobiveni u ovoj analizi, za spojeve koji su usmjereni na vanstanične receptore ili enzime, predskazuju učinkovitost tih spojeva *in vivo* (Rabbani *et al.*, *Int. J. Cancer* **1995**, 63 : 840-845).

U takvim se analizama koriste umetci kulture tkiva iz transjažice. Invazivne stanice su definirane kao stanice koje su sposobne proći kroz Matrigel® i gornji aspekt polikarbonatne membrane te se pričvrstiti za dno membrane. Transjažice

(Costar) koje sadrže polikarbonatne membrane (veličina pora 8.0 μm) su presvućene s Matrigel®-om (Collaborative Research), koji je bio razrijeđen u sterilnom PBS-u do konačne koncentracije od 75 $\mu\text{g/mL}$ (60 μL razrijeđenog Matrigel®-a po umetku), i postavljene u jažice posude s 24 jažica. Membrane su sušene preko noći u biološki sigurnom prostoru, zatim rehidrirane dodavanjem 100 μL DMEM koji sadrži antibiotike kroz 1 sat na stolu za trešnju. DMEM je uklonjen iz svakog umetka pomoću usisavanja, te je svakoj jažici u posudi s 24 jažice dodano 0.8 mL DMEM/10% FBS/antibiotici na takav način da ono opkoljuje vanjštinu transjažice ("donja komora"). Svježi DMEM/antibiotici (100 μL), humani Glu-plazminogen (5 $\mu\text{g/mL}$), i bilo koji inhibitori koji se trebaju ispitati su dodani na vrh, unutar transjažice ("gornja komora"). Stanice koje se treba ispitati su tripsinizirane i resuspendirane u DMEM/antibioticima, zatim su dodane u gonju komoru transjažice pri konačnoj koncentraciji od 800,000 stanica/mL. Konačni volumen gornje komore je podešen na 200 μL . Pripremljena posuda je zatim inkubirana u vlažnoj 5%-tnoj atmosferi CO_2 kroz 72 sata. Nakon inkubacije, stanice su fiksirane i obojane korištenjem DiffQuik® (Giemsa boja), a gornja komora je ostrugana korištenjem vate na štapiću kako bi se uklonio Matrigel® i sve stanice koje nisu invadirale kroz membranu. Membrane su odvojene od transjažice korištenjem X-acto® noža, postavljene na predmetna stakalca korištenjem Permount® i pokrovnica, zatim izbrojane pod visokosnažnim (400x) poljem. Prosječna vrijednost broja stanica koje su invadirale je određen iz 5-10 izbrojanih polja te je izrađena krivulja kao funkcija koncentracije inhibitora.

Analiza protuangiogeničnog djelovanja pomoću stvaranja cjevčica

Endotelne stanice, na primjer, endotelne stanice humane umbilikalne vene (HUVEC) ili humane mikrovaskularne endotelne stanice (HMVEC) koje se mogu pripremiti ili nabaviti komercijalno, su miješane pri koncentraciji od 2×10^5 stanica/mL s fibrinogenom (5 mg/mL u fosfatom puferiranoj slanoj otopini (PBS) u omjeru od 1 : 1 (v/v). Trombin je dodan (5 jedinica/mL konačne koncentracije) te je mješavina odmah prenesena u posudu s 24 jažice (0.5 mL po jažici). Pušteno je da se oblikuje fibrin gel, te su zatim dodani VEGF i bFGF u jažice (svaki pri konačnoj koncentraciji od 5 ng/mL) zajedno s ispitivanim spojem. Stanice su inkubirane pri temperaturi od 37°C u 5% CO_2 kroz 4 dana u kojem vremenu su stanice u svakoj jažici izbrojane i klasificirane bilo kao okrugle, bilo kao izdužene bez ogranaka, bilo kao izdužene s jednim ogrankom, bilo kao izdužene s dva ili više ogranaka. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost od 5 različitih jažica za svaku koncentraciju spoja. Tipično, u prisustvu angiogeničnih inhibitora, stanice ostaju ili okrugle ili oblikuju nediferencirane cjevčice (na primjer 0 ili 1 ogranak). Ta se analiza prepoznaje u struci kao ona koja može predskazati angiogeničnu (ili antiangiogeničnu) učinkovitost *in vivo* (Min *et al.*, *Cancer Res.* **1996**, 56 : 2428-2433).

U zamjenskoj analizi, stvaranje cjevčica endotelnih stanica se posmatra kada se endotelne stanice postavljene u kulturu na Matrigel®-u (Schnaper *et al.*, *J. Cell. Physiol.* **1995**, 165 : 107-118). Endotelne stanice (1×10^4 stanica po jažici) su prenesene na Matrigel®-om presvućene posude s 24 jažica, a stvaranje cjevčica je kvantificirano nakon 48 sati. Inhibitori su ispitivani pomoću njihovog dodavanja bilo u isto vrijeme s endotelnim stanicama bilo u raznim vremenskim periodima nakon toga. Stvaranje cjevčica se također može stimulirati pomoću dodavanja (a) angiogeničnih činioca rasta kao što su bFGF ili VEGF, (b) sredstava koja stimuliraju diferencijaciju (na primjer, PMA) ili (c) njihove kombinacije.

Pored toga što se ne želi vezati za teoriju, ova analiza pruža model angiogeneze pomoću izlaganja endotelnim stanicama određenog tipa osnovne membrane, naime sloja matriksa za koji bi se moglo očekivati da migrirajuće i diferencirajuće endotelne stanice prvo sretnu. Dodatno vezanim činiocima rasta, komponente matriksa pronađene u Matrigel®-u (kao i u osnovnim membranama *in situ*) ili njihovi proteolitički produkti mogu također biti stimulatori za stvaranje cjevčica endotelnih stanica što čini ovaj model komplementaran modelu fibrin gel angiogeneze koji je prethodno opisan (Blood *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* **1990**, 1032:89-118; Odedr *et al.*, *Pharmac. Ther.* **1991**, 49:111-124).

Analize inhibiranja proliferacije

Sposobnost spojeva izuma da inhibiraju proliferaciju endotelnih stanica može se odrediti u formatu 96 jažica. Kolagen tipa I (želatina) se koristi za presvlačenje jažica posude (0.1-1 mg/mL u PBS-u, 0.1 mL po jažici kroz 30 minuta pri sobnoj temperaturi). Nakon pranja posude (3x w/PBS), 3-6,000 stanica je postavljeno po jažici te su puštene da se pričvrste kroz 4 sata (37°C/5% CO_2) u endotelnom mediju za rast (Endothelial Growth Medium, EGM; Clonetics) ili M199 mediju koji sadrži 0.1-2% FBS. Medij i sve nepričvršćene stanice se uklanjaju nakon 4 sata te se svakoj jažici dodaje svježi medij koji sadrži bFGF (1-10 ng/mL) ili VEGF (1-10 ng/mL). Spojevi koji se trebaju ispitati su dodani zadnji te je posuda puštena da se inkubira (37°C/5% CO_2) kroz 24-48 sati. MTS (Promega) je dodan u svaku jažicu i pušten da se inkubira između jednog i četiri sata. Apsorpcija pri 490nm, koja je proporcionalna broju stanica, je zatim izmjerena kako bi se odredile razlike u proliferaciji između kontrolnih jažica i onih koje sadrže ispitivane spojeve.

Slični sustav analize može se postaviti s adherentnim tumorskim stanicama postavljenima u kulturu. Ipak, u ovom se formatu može ispustiti kolagen. Tumorske stanice (na primjer, 3,000 - 10,000 po jažici) su postavljene u posudu i puštene da se pričvrste preko noći. Medij bez seruma se zatim dodaje u jažice, a stanice su sinhronizirane kroz 24 sata. Medij koji sadrži 10% FBS je zatim dodan u svaku jažicu kako bi se stimulirala proliferacija. Spojevi koji se trebaju

ispitati su uključeni u nekim jažicama. Nakon 24 sati, MTS je dodan u posudu te je analiza razvijena i očitana kao što je opisano gore.

Analize citotoksičnosti

5

Antiproliferativni i citotoksični učinci spojeva izuma se mogu odrediti za razne tipove stanica uključujući tumorske stanice, endotelne stanice, fibroblaste i makrofage. To je posebno korisno kada se testira spoj izuma koji je bio konjugiran za terapijski dio kao što su radioterapeutska sredstva ili toksin. Na primjer, za konjugat jednog od spojeva izuma s Bolton-Hunter reagensom koji je bio jodiran s ^{131}I očekivalo bi se da inhibira proliferaciju stanica koje ispoljavaju PHSCN vezno mjesto/receptor (najvjerojatnije pomoću poticanja apoptoze). Protuproliferativni učinci bi se očekivali u odnosu na tumorske stanice i stimulirane endotelne stanice ali, pod nekim okolnostima i na endotelne stanice koje ne miruju ili normalne humane dermalne fibroblaste. Svi kod normalnih stanica opaženi protuproliferativni ili citotoksični učinci mogu predstavljati nespecifičnu toksičnost konjugata.

10

15

Tipična bi analiza uključivala postavljanje stanica pri gustoći od 5-10,000 stanica po jažici u posudu s 96 jažica. Spoj koji se treba ispitati je dodan pri koncentraciji $10 \times \text{IC}_{50}$ koji je izmjeren u analizi vezanja (to će varirati zavisno od konjugata) i pušten da se inkubira sa stanicama kroz 30 minuta. Stanice su isprane 3X s medijem, zatim je svježi medij koji sadrži [^3H]timidin ($1 \mu\text{Ci/mL}$) dodan stanicama te su one puštene da se inkubiraju pri temperaturi od 37°C pri 5% CO_2 kroz 24 i 48 sati. Stanice su lizirane u raznim vremenskim periodima korištenjem 1M NaOH i te su rezultati po jažici određeni korištenjem β -brojača. Proliferacija može biti izmjerena neradioaktivno korištenjem MTS reagensa ili CyQuant[®]-a kako bi se izmjerio ukupni broj stanica. Za analize citotoksičnosti (mjerenje lize stanica), koristi se Promega komplet za citotoksičnost s 96 jažica. Ako postoji dokaz antiproliferativnog djelovanja, poticanje apoptoze može biti izmjereno korištenjem TumorTACS-a (Genzyme).

20

25

Djelovanje kaspaze-3

Sposobnost spojeva izuma da promiču apoptozu endotelnih stanica se može odrediti pomoću mjerenja aktivacije kaspaze-3. Kolagen tipa I (gelatin) se koristi za presvlačenje P100 posude, a 5×10^5 endotelnih stanica je postavljeno u EGM koji sadrži 10% FBS. Nakon 24 sata (pri temperaturi od 37°C u 5% CO_2) medij je zamijenjen EGM-om koji sadrži 2% FBS, 10 ng/ml bFGF i željeni ispitivani spoj. Stanice su sakupljene nakon 6 sati, stanični lizati pripremljeni u 1%-tnom Triton-u i analizirani korištenjem "EnzChek[®]Caspase-3 Assay kit #1" kompleta za analizu (Molecular Probes) u skladu s uputama proizvođača.

30

Model kornealne angiogeneze (angiogeneza u rožnici)

Protokol koji se koristi je, u biti, identičan onome opisanom od strane Volpert *et al.*, *J. Clin. Invest.* **1996**, 98 : 671-679. U kratko, ženski Fischer štakori (120-140 grama) su anestetizirani, te su peleti (5 μ l) sastavljeni od Hidron®-a, bFGF-a (150nM), i spojeva koji se trebaju ispitati implantirani u malene ureze načinjene u rožnici 1.0 - 1.5 mm od limbusa. Neovaskularizacija je procijenjena 5 i 7 dana nakon implantacije. Na dan 7, životinje su anestetizirane i infuzirane s bojom kao što je koloidni ugljik kako bi se obojale žile. Životinje su zatim eutanazirane, rožnice su fiksirane s formalinom, te su rožnice spljoštene i fotografirane kako bi se procijenio stupanj neovaskularizacije. Nove žile mogu biti kvantificirane pomoću prikaza ukupne površine žila ili dužine ili jednostavno pomoću brojanja žila.

Analiza pomoću Matrigel® punjenja

Ta je analiza izvedena u biti kao što je opisana od strane Passaniti *et al.*, **1992**, *Lab Invest.* 67 : 519-528. Ledeni Matrigel® (na primjer, 500 μ L) (Collaborative Biomedical Products, Inc., Bedford, MA) je miješan s heparinom (na primjer, 50 μ g/ml), FGF-2 (na primjer, 400 ng/ml) i spojem koji se treba ispitati. Kod nekih analiza, bFGF može biti zamijenjen tumorskim stanicama kao angiogeničnim stimulusom. Matrigel® mješavina je injektirana subkutano u 4-8 tjedna stare atimične imunodeficientne ("nude") miševe na mjestima blizu abdominalne osi, preferira se 3 injekcije po mišu. Injektirani Matrigel® oblikuje palpabilan kruti gel. Mjesta injektiranja su odabrana tako da svaka životinja primi punjenje s pozitivnom kontrolom (kao što je FGF-2 + heparin), punjenje s negativnom kontrolom (na primjer, pufer + heparin) i punjenje koje uključuje spoj koji se ispituje na svoj učinak na angiogenezu, na primjer, (FGF-2 + heparin + spoj). Preferira se da se svi tretmani izvode u trostruko. Životinje su žrtvovane pomoću cervikalne dislokacije približno 7 dana nakon injektiranja ili u neko drugo vrijeme koje može biti optimalno za promatranje angiogeneze. Mišja koža je odvojena uzduž abdominalne osi, te su Matrigel® punjenja rekuperirana i odmah skenirana na visokoj rezoluciji. Punjenja su zatim dispergirana u vodi i inkubirana pri temperaturi od 37°C preko noći. Razine hemoglobina (Hb) su određene korištenjem Drabkin-ove otopine (na primjer, dobavljene od Sigma) u skladu s uputama proizvođača. Količina Hb u punjenju je neizravna mjera angiogeneze pošto odražava količinu krvi u uzorku. Dodatno, ili alternativno, životinje mogu biti injektirane prije žrtvovanja s 0.1 ml pufera (preferira se PBS-a) koji sadrži dekstran visoke molekularne mase na kojeg je konjugiran fluorofor. Količina fluorescencije u dispergiranom punjenju, određena fluorimetrijski, također služi kao mjera angiogeneze u punjenju. Bojanje s mAb anti-CD31 (CD31 predstavlja "molekulu za adheziju krvnih pločica-endotelnih stanica" ili engl. "platelet-endothelial cell adhesion molecule - PECAM") se može također koristiti kako bi se potvrdilo stvaranje novih krvnih žila i odredila gustoća mikrožila u punjenjima.

Analiza angiogeneze kod korioalantoičke membrane (CAM) pilet

Ova se analiza izvodi u osnovi kao što je opisana od strane Nguyen *et al.*, *Microvascular Res.* **1994**, 47 : 31-40. Sito koje sadrži bilo angiogenične činioce (bFGF) bilo tumorske stanice plus inhibitore je postavljeno na CAM osmodnevnog embria pilet te je CAM posmatrana kroz 3-9 dana nakon implantacije uzorka. Angiogeneza je kvantificirana pomoću određivanja postotka kvadrata *in situ* koji sadrže krvne žile.

In vivo procjena inhibicije angiogeneze i protutumorskih učinaka korištenjem analize Matrigel® punjenja s tumorskim stanicama

U ovoj analizi, tumorske su stanice, na primjer 1-5 x 10⁶ stanica 3LL Lewis karcinoma pluća ili stanične linije MatLyLu prostate štakora, miješane s Matrigel®-om te su zatim injektirane u miševe slabine u skladu s protokolom opisanom gore kod Odjeljka B. Masa tumorskih stanica i snažan angiogenični odgovor može se opaziti kod punjenja nakon približno 5 to 7 dana. Protutumorsko i protuangiogenično djelovanje spoja u stvarnom tumorskom okruženju može se ocijeniti pomoću njegovog uključivanja u punjenje. Zatim se mjeri masa tumora, razine Hb ili razine fluorescencije (dekstran-fluorofor konjugata injektiranog prije žrtvovanja). Kako bi se izmjerili Hb ili fluorescencija, punjenja su prvo homogenizirana pomoću homogenizatora tkiva.

Model ksenografta subkutanog (s.c.) rasta tumora

Imunodeficientni ("nude") miševi su inkulirani s MDA-MB-231 stanicama (humani karcinom grudi) i Matrigel®-om (1 x 10⁶ stanica u 0.2mL) s.c. u desnu slabinu životinje. Tumori su pušteni da se razviju do 200 mm³, a zatim je počeo tretman s ispitivanom mješavinom (100 μ g po životinji dnevno q. d. IP). Volumeni tumora su dobiveni svaki drugi dan te su životinje žrtvovane nakon 2 tjedna tretmana. Tumori su izrezani, izvagani i uklopljeni u parafin. Histološki odsjeci tumora su analizirani pomoću H i E, anti-CD31, Ki-67, TUNEL, i CD68 bojanja.

Model ksenografta metastaze

spojevi izuma su također ispitivani na inhibiciju kasnih metastaza korištenjem eksperimentalnog modela metastaze (Crowley *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90 5021-5025). Kasna metastaza uključuje korake vezanja i izljeva tumorskih stanica, lokalnu invaziju, usadivanje, proliferaciju i angiogenezu. Stanice humanog karcinoma prostate

(PC-3) transfektirane s reporter genom, preferira se "green fluorescent protein" (GFP) genom, ali alternativno s genom koji kodira enzime kloramfenikolacetil-transferazu (CAT), luciferazu ili LacZ, su inokulirane u imunodeficientne ("nude") miševе. Taj pristup dozvoljava korištenje bilo kojeg od tih markera (fluorescencijsko dokazivanje GFP-a ili histokemijsko kolorimetrijsko dokazivanje enzimatskog djelovanja) kako bi se pratila sudbina tih stanica. Stanice su injektirane, preferira se iv, a metastaze identificirane nakon približno 14 dana, osobito u plućima ali također u regionalnim limfnim čvorovima, femuru i mozgu. To oponaša tropizam prema organima, metastaza koje se prirodno pojavljuju kod humanog raka prostate. Na primjer, PC-3 stanice koje ispoljavaju GFP (1×10^6 stanica po mišu) su injektirane iv u repne vene imunodeficientnih ("nude")(*nu/nu*) miševa. Životinje su tretirane s ispitivanom mješavinom pri 100 µg po životinji dnevno q. d. IP. Jednostruke metastatske stanice i žarišta su vizualizirana i kvantificirana pomoću fluorescencijske mikroskopije ili histokemije svjetlosnim mikroskopom ili pomoću mljevenja tkiva i kvantitativne kolorimetrijske analize detektabilnih označivača.

Inhibicija spontanah metastaza in vivo pomoću PHSCN i funkcionalnih derivata

Sustav singeničnog raka grudi štakora uključuje Mat BIII stanice raka grudi štakora (Xing *et al.*, *Int. J. Cancer* **1996**,67 : 423-429). Tumorske stanice, na primjer, približno 10^6 , suspendirane u 0.1 mL PBS, su inokulirane u masne jastučice grudiju ženki Fisher štakora. U vrijeme inokulacije, 14-odnevna Alza osmotska mini-pumpa je implantirana intraperitonealno kako bi izdavala ispitivani spoj. Spoj je otopljen u PBS-u (na primjer, 200 mM, osnovna otopina), sterilno filtriran i napunjen u minipumpu kako bi se postigla brzina otpuštanja od približno 4 mg/kg/dan. Kontrolne životinje primaju sami prijenosnik (PBS) ili kontrolni peptid za prijenosnik u minipumpu. Životinje su žrtvovane približno na 14. dan. Kod štakora tretiranih spojevima ovog izuma mogu se opaziti značajna smanjenja u veličini primarnog tumora i u broju metastaza u slezeni, plućima, jetrima, bubregu i limfnim čvorovima (pobrojanih kao odvojena žarišta). Histološka i imunohistokemijska analiza otkriva pojačanu nekrozu i znakove apoptoze kod tumora u tretiranih životinja. Velika nekrotska područja su viđena u regijama tumora kojima nedostaje neovaskularizacija. Humani ili zečji PHSCN i njegovi derivati za koje je konjugiran ^{131}I (bilo 1 bilo 2 atoma joda po molekuli peptida) su učinkoviti radioterapeutici te je za njih pronađeno da su najmanje dvostruko moćniji od nekonjugiranih polipeptida. Nasuprot tome, tretman s kontrolnim peptidima nije uspio uzrokovati značajnu promjenu u veličini tumora ili metastaza.

3LL Lewis karcinom pluća: primarni rast tumora

Ta se tumorska linija pojavila spontano kao karcinom pluća kod C57BL/6 miša (Malave *et al.*, *J. Nat'l. Canc. Inst.* **1979**,62 : 83-88). Razvijena je kod C57BL/6 miševa pomoću subkutane (sc) inokulacije te je ispitivana kod semialogeničnih C57BL/6 xDBA/2F₁ miševa ili kod alogeničnih C3H miševa. Tipično je korišteno šest životinja po grupi za subkutano (sc) implantiranje, ili deset za intramuskularno (im) implantiranje. Tumor može biti implantiran se kao 2-4 mm veliki dio, ili im ili sc kao inokulum suspendiranih stanica od približno $0.5\text{--}2 \times 10^6$ stanica. Tretman počinje 24 sata nakon implantiranja ili se odgađa sve dok se ne može napipati tumor specifične veličine (obično približno 400 mg). Ispitivani spoj se daje ip dnevno kroz 11 dana.

Životinje se prate vaganjem, palpacijom, i mjerenjem veličine tumora. Tipična masa tumora kod netretiranih kontrolnih recipijenata na dan 12. nakon im inokulacije iznosi 500-2500 mg. Tipično srednje vrijeme preživljavanja iznosi 18-28 dana. Spoj za pozitivnu kontrolu, na primjer ciklofosamid koristi se u količini od 20 mg/kg po injekciji dnevno na dan 1-11. Izračunati rezultati uključuju srednju vrijednost mase životinje, veličinu tumora, masu tumora, vrijeme preživljavanja. Za potvrđeno terapijsko djelovanje, ispitivana mješavina se treba ispitivati u dvije analize s višestrukim dozama.

3LL Lewis karcinom pluća: model primarnog rasta i metastaze

Ova analiza je dobro poznata u struci (Gorelik *et al.*, *J. Nat'l. Canc. Inst.* **1980**,65 : 1257-1264; Gorelik *et al.*, *Rec. Results Canc. Res.* **1980**, 75 : 20-28; Isakov *et al.*, *Invasion Metas.* 2: 12-32 (1982); Talmadge *et al.*, *J Nat'l. Canc. Inst.* **1982**, 69 : 975-980; Hilgard *et al.*, *Br.J. Cancer* **1977**, 35 : 78-86). Ispitivani miševi su C57BL/6 miševi muškog spola, 2-3 mjeseca stari. Nakon sc, im, ili implantacije u jastučić stopala, ovaj tumor proizvodi metastaze, preferencijalno u plućima. Kod nekih linija tumora, primarni tumor vrši protumetastatske učinke i mora se prvo izrezati prije studije metastatske faze (pogledaj također U. S. Patent No. 5,639,725).

Suspenzije pojedinačnih stanica su pripravljene od krutih tumora tretiranjem mljevenog tumorskog tkiva s 0.3%-tnom otopinom tripsina. Stanice su isprane 3 puta s PBS-om (pH 7.4) i suspendirane u PBS-u. Vitalnost 3LL stanica pripremljenih na ovaj način je općenito približno 95-99% (ekskluzijom pomoću tripan blue bojila). Vitalne tumorske stanice ($3 \times 10^4\text{--}5 \times 10^6$) suspendirane u 0.05 ml PBS-a su injektirane subkutano, bilo u dorzalnu regiju bilo u jedan jastučić stopala stražnje noge C57BL/6 miševa. Vidljivi tumori se pojavljuju 3-4 dana nakon dorzalnog se injektiranja 10^6 stanica. Dan pojavljivanja tumora i promjeri izgrađenih tumora su izmjereni pomoću šestara za mjerenje šupljina svaka dva dana. Tretman je dan u obliku jedne do pet doza peptida ili derivata tjedno. U slijedećem aspektu, peptid se isporučuje pomoću osmotske minipumpe.

Kod eksperimenata koji uključuju izrezivanje tumora u slučaju dorzalnih tumora, kada tumori dostignu veličinu od približno 1500 mm³, miševi su nasumično podijeljeni u dvije grupe: (1) primarni tumor je potpuno izrezan; ili (2) izvedena je lažna operacija, a tumor je ostavljen intaktan. Premda tumori veličine od 500-3000 mm³ inhibiraju rast metastaza, veličina od 1500 mm³ je gornja granica za veličinu primarnog tumora nad kojim se može sa sigurnošću izvršiti resekcija s visokim stupnjem preživljavanja i bez ponovnog lokalnog rasta tumora. Nakon 21 dan, svi miševi su žrtvovani i autopsirani.

Pluća se uklanjaju i važu. Pluća su fiksirana u Bouin-ovoj otopini te je zabilježen broj vidljivih metastaza. Promjeri metastaza su također izmjereni korištenjem binokularnog stereoskopa opremljenog s okularom koji sadrži mikrometar, pod povećanjem od 8X. Na osnovu zabilježenih promjera, moguće je izračunati volumen svake metastaze. Kako bi se odredio ukupni volumen metastaza po jednim plućima, srednja vrijednost broja vidljivih metastaza je pomnožena sa srednjom vrijednošću volumena metastaza. Kako bi se dalje odredio metastatski rast, moguće je izmjeriti ugrađivanje ¹²⁵IdUrd u stanice pluća (Takur *et al.*, *J. Lab. Clin. Med.* **1977**, 89 : 217-228). Deset dana nakon amputacije tumora, 25 µg fluorodeoksiuridina je inokulirano u peritoneume miševa koji nose tumor (te, ako se koriste u pokusu, miševa kojima je nad tumorom izvršena resekcija). Nakon 30 minuta, miševima je dano 1 µCi ¹²⁵IdUrd (joddeoksiuridin). Jedan dan kasije, pluća i slezene se uklanjaju i važu, a stupanj ugrađivanja ¹²⁵IdUrd je izmjeren korištenjem gama brojača.

Kod miševa s tumorima stopalnog jastučića, kada tumori dostignu približno 8-10 mm u promjeru, miševi se nasumično podijele u dvije grupe: (1) noge s tumorima su amputirane nakon povezivanja iznad koljenskih zglobova; ili (2) miševi su ostavljeni intaktni kao kontrole s neamputiranim tumorima. (Amputacija noge u kojoj ne postoji tumor kod miševa koji nose tumor nema poznati učinak na buduću metastazu, što isključuje moguće učinke anestezije, stresa ili operacije). Miševi su ubijeni 10-14 dana nakon amputacije. Metastaze su ocijenjene kao što je opisano gore.

Statistički podaci: Vrijednosti koje predstavljaju incidenciju metastaza i njihov rast u plućima miševa koji nose tumor nisu normalno distribuirane. Stoga se za analizu mogu koristiti neparametrički statistički podaci kao što su Mann-Whitney U-Test.

Studija tog modela od strane Gorelik *et al.*(1980, navedeno gore) je pokazala da je veličina inokuluma tumorskih stanica odredila raspon metastatskog rasta. Učestalost metastaze u plućima operiranih miševa je bila različita od miševa koji nose primarni tumor. Tako je u plućima miševa kod kojih je primarni tumor bio induciran pomoću inokulacije većih doza 3LL stanica (1-5x 10⁶) nakon čega je slijedilo kirurško uklanjanje, broj metastaza bio niži nego onaj kod neoperiranih miševa koji nose tumor, makar je volumen metastaza bio veći nego kod neoperiranih kontrolnih životinja. Korištenjem ugrađivanja ¹²⁵IdUrd kao mjere za metastazu pluća, nisu bile pronađene značajne razlike između pluća miševa kojima je izrezan tumor i miševa koji nose tumor, a koji su bili prvobitno inokulirani s 10⁶ 3LL stanica. Amputacija tumora izvršena nakon inokulacije 10⁵ tumorskih stanica je dramatično ubrzala metastatski rast. Ti rezultati su bili u skladu s preživljavanjem miševa nakon izrezivanja lokalnih tumora. Fenomen ubrzavanja metastatskog rasta nakon izrezivanja lokalnih tumora je bio ponovno i iznova zamijećen (na primjer, pogledaj U. S. Patent No. 5,639,725). Ta opažanja imaju implikacije za prognozu pacijenata koji se podvrgavaju kirurgiji raka.

Analiza kompeticijskog vezanja s DU145 stanicama raka prostate

Ovo se može provesti korištenjem 6 koncentracija peptida kako bi se odredio IC₅₀. Ova je analiza surogat marker biološkog djelovanja. U kratko, DU145 stanice su sakupljene kratkom inkubacijom s tripsinom, dodani su peptidni derivat koji se treba ispitati (kompetitor) i standard te je suspenzija tresena kod temperature od 4°C kroz 2 sata. Stanice su peletirane, supernatant usisan, PBS je dodan te je postupak ponavljan tri puta (ispiranje). HRP-Streptavidin je dodan, pušten da se veže nakon čega su slijedili drugi nizovi koraka ispiranja. Odgovarajući HRP supstrat je dodan te je razvijena boja unutar prethodno definiranog linearnog dijela reakcije.

Analiza proliferacije humanih endotelnih stanica (HUVEC)

Analiza se provodi analizom u 96 jažica, a traje 48 sati. U kratko, HUVEC (Cascade Biologicals) su postavljene u kulturu preko noći u M200 koji sadrži 2% FBS-a. Slijedeći dan, 3,000 stanica je postavljeno u svakoj jažici želatinom presvućene posude s 96 jažica. Stanice su puštene da se prionu i razastiru kroz 4-6 sata, u koje je vrijeme medij zamijenjen svježim medijem koji sadrži 2% FBS-a, 1 ng/mL FGF-2, i različite koncentracije specifičnih ispitivanih spojeva. Stanice su zatim postavljene u kulturu dodatnih 48 sati, a relativne količine stanica u svakoj jažici su određene korištenjem "Cell Titer Aqueous Cell Proliferation Analysis" (Promega). Rezultat će predstavljati IC₅₀ koji se može usporediti sa standardnim spojem. To je analiza koja odražava biološko djelovanje derivata peptida na svoje ciljane stanice.

Raspon za doziranje i kinetički podaci

Četiri doze peptida (2, 4, 8 i 10 µCi za biodistribuciju te 10, 50, 100 i 200, µCi za Gama scintigrafiju) su injektirane kroz repnu venu u C57B1/6 miševe koji nose tumor (stanice B16F10 melanoma - 200-300 mm³). Najniža i najviša doziranja peptida su ispitivana prva i druga. Tako je moguće da se doziranje derivata peptida koji se treba ispitati može modificirati, zasnovano na početnim dobivenim rezultatima.

(Grupa I, Dozimetrija 3 životinje po dozi) Životinje će biti žrtvovane 2 sata nakon doziranja s peptidima označenima sa ¹²⁵I. Tumori (teoretski visoke vrijednosti) i srca (teoretski niske vrijednosti) će zatim biti uklonjeni, a radioaktivnost izmjerena.

(Grupa 2 Gama scintigrafija 3 životinje po dozi) Životinje su anestetizirane te je izrađen prikaz (gama scintigrafija) 2 sata nakon injektiranja peptida radiooznačenog sa ¹²⁵I. Doziranje peptida je odabrano na osnovu tih rezultata.

Izvedivost prikaza

Peptid označen sa ¹²⁵I, u dozi koja je određena pomoću metode iz odlomka 4.4.17 biti će injektiran kroz repnu venu u miševe koji nose tumor (tumor veličine 200-300 mm³). Po tri miša će biti anestetizirani te će im se izraditi prikaz nakon 0,5 sata, 1 sat, 2 sata, 4 sata, 6 sati, 24 sata, i 48 sati što će odrediti optimalno vrijeme za prikaz. Kao kontrola će neoznačeni peptid u 100-strukom molarnom suvišku biti koinjektiran s peptidom označenim sa ¹²⁵I kako bi se pokazala ekvivalencija obe vrste.

Metode rekombinantne DNA

Opće metode molekularne biologije su bile i više nego dovoljno opisane u struci (Sambrook, *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. izdanje (ili novije), Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989; Ausube *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 2, Wiley-Interscience, New York, (sadašnje izdanje); Kriegler, *Gene Transfer and Expression : A Laboratory Manual* (1990); Glover, DM, editor, *DNA Cloning : A Practical Approach*, vol. I & II, IRL Press, 1985; Alberts *et al.*, *Molecular Biology of the Cell*, 2. izdanje (ili novije), Garland Publishing, Inc. , New York, NY (1989); Watson *et al.*, *Recombinant DNA*, 2. izdanje (ili novije), Scientific American Books, New York, 1992; i Old *et al.*, *Principles of Gene Manipulation : An Introduction to Genetic Engineering*, 2. izdanje (ili novije), Universiti of California Press, Berkeley, CA(1981)).

Osim ukoliko je drugačije naznačeno, namjera je da osobita sekvenca nukleinske kiseline obuhvaća njihove varijante s konzervativnim supstitucijama (na primjer, supstitucije degeneriranog kodona) i komplementarne sekvence. Pojam "nukleinska kiselina" je sinonim za "polinukleotid" te se namjerava da uključuju gen, cDNA molekulu, mRNA molekulu, kao i fragment bilo koje od njih, kao što je oligonukleotid, i nadalje, njihove ekvivalente (detaljnije objašnjeno dolje). Veličine nukleinskih kiselina su naznačene bilo u obliku kilobaza (kb) bilo parova baza (bp). Te su vrijednosti procjene izvedene iz elektroforeze na agarozu ili poliakrilamid gelu (PAGE), iz nukleinsko kiselinskih sekvenca koje su određene od strane korisnika ili su objavljene. Veličina proteina je izražena u obliku molekularne mase u kilodaltonima (kDa) ili kao dužina (broj amino kiselinskih ostataka). Veličina proteina je procijenjena iz PAGE, iz sekvenciranja, iz pretpostavljenih amino kiselinskih sekvenca zasnovanih na kodirajućoj nukleinsko kiselinskoj sekvenci ili iz objavljene amino kiselinske sekvence.

Specifično, DNA molekule koje kodiraju amino kiselinsku sekvencu koja odgovara peptidnim multimerima ovog izuma, ili njihovim aktivnim varijantama, mogu se sintetizirati pomoću lančane reakcije polimeraze (PCR) (pogledaj, na primjer, U. S. Patent No. 4,683,202) korištenjem primera izvedenog iz sekvence ovdje objavljenog proteina. Te se cDNA sekvence zatim mogu udružiti u eukariotski ili prokariotski ekspresijski vektor, te se rezultirajući vektor može koristiti za izravnu sintezu fuzijskog polipeptida ili njegovog fragmenta ili derivata pomoću odgovarajuće stanice domaćina, na primjer COS ili CHO stanica.

Namjera je da pojam "nukleinska kiselina" kao što se ovdje koristi uključuje takve fragmente ili ekvivalente. Nukleinsko kiselinske sekvence ovog izuma mogu biti DNA ili RNA. Prokariotske ili eukariotske stanice domaćini transformirane ili transfektirane kako bi ispoljavale multimerne nalaze se unutar područja izuma. Na primjer, peptidni multimer se može

ispoljavati u bakterijskim stanicama kao što je *E. coli*, stanicama kukaca (bakulovirus), kvascima, ili stanicama sisavaca kao što su stanice jajnika kineskog hrčka (CHO) ili humane stanice (koji se preferiraju za humano terapijsko korištenje transfektiranih stanica). Drugi prikladni domaćini su poznati iskusnim stručnjacima. Ispoljavanje kod eukariotskih stanica dovodi do djelomične ili potpune glikozilacije i/ili stvaranja relevantnih unutarlančanih ili međulančanih disulfidnih veza kod rekombinantnih polipeptida. Primjeri vektora za ekspresiju kod kvasca *S. cerevisiae* uključuje pYepSec1 (Baldari *et al.*, **1987**, *EMBO J.* 6: 229-234), pMFa (Kurjan *et al.* **1982** *Cell* 30 : 933-943), pJRY88 (Schultz *et al.*, **1987**, *Gene* 54: 113-123), i pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, Calif.). Bakulovirus vektori dostupni za ekspresiju proteina kod stanica kukaca postavljenih u kulturu (SF 9 stanice) uključuju pAc serije (Smit *et al.*, **1983**, *Mol. Cell Biol.* 3: 2156-2165) i pVL serije (Lucklow *et al.*, (1989) *Virology* 170: 31-39). Općenito, COS stanice (Gluzman **1981** *Cell* 23: 175-182) se koriste u vezi s vektorima kao što je pCDM 8 (Aruffo *et al.*, navedeno gore, za prolaznu amplifikaciju/ekspresiju kod stanica sisavaca, dok CHO (*dhfr*-negativne CHO) stanice se koriste s vektorima kao što je pMT2PC (Kaufman *et al.*, **1987**, *EMBO J.* 6: 187-195) za stabilnu amplifikaciju/ekspresiju kod stanica sisavaca. Stanična linija NSO mijeloma (sustav ekspresije glutamin sintetaze) je dostupna od strane Celltech Ltd.

Proizvodnja prikladnih vektora koji sadrže željene kodirajuće i kontrolne sekvence uključuje standardne ligacijske i restriksijske tehnike koji su dobro poznate u struci. Izolirani plazmidi, DNA sekvence, ili sintetizirani oligonukleotidi su otcijepljeni, skrojeni, i ponovno povezani u željeni oblik. DNA sekvence koje oblikuju vektore su dostupne od strane brojnih izvora. Vektori osnovnog kostura i kontrolni sustavi se općenito nalaze na dostupnim vektorima "domaćinima" koji se koriste za većinu sekvenca u izradi. Za pripadajuće kodirajuće sekvence, početak izgradnje može predstavljati, te obično i predstavlja, pronalaženje odgovarajućih sekvenca iz cDNA ili genomskih DNA biblioteka. Ipak, jednom kada se sekvenca objavi, moguće je sintetizirati čitavu sekvencu gena *in vitro* počevši od pojedinačnih derivata nukleotida. Čitave sekvence gena za gene prilične dužine, na primjer, 500-1000 bp mogu se pripremiti pomoću sintetiziranja pojedinačnih preklapajućih komplementarnih oligonukleotida i dodavanjem jednostrukih lanaca nepreklapajućih dijelova korištenjem DNA polimeraze u prisustvu trifosfata deoksiribonukleotida. Taj je pristup bio korišten uspješno u izgradnji nekoliko gena poznate sekvence. Pogledaj, na primjer, Edge, *Nature* **1981**, 292 : 756; Nambair *et al.*, *Science* **1984**, 223 : 1299; i Jay, *J. Biol. Chem.* **1984**, 259 : 6311.

Sintetski oligonukleotidi se pripremaju bilo pomoću fosfortriester metode kao što je opisano od strane referenca citiranih gore bilo pomoću fosforamidit metode kao što je opisano od strane Beaucage *et al.*, *Tetrahedron Lett.* **1981**, 22 : 1859; i Matteucci *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, 103 : 3185 te se mogu pripremiti korištenjem automatiziranih sintetizatora oligonukleotida komercijalno dostupnih na tržištu. Tretman jednostrukih lanaca kinazom prije postupka ili za označavanje se postiže korištenjem dobro poznatih metoda.

Jednom kada su komponente željenog vektora dostupne, mogu se izrezati i povezati korištenjem standardnih restriksijskih i ligacijskih postupaka. Vezanje DNA, specifično na mjesto, se izvodi pomoću tretiranja s prikladnim restriksijskim enzimom (ili enzimima) pod uvjetima koji se općenito podrazumijevaju u struci, a čije su osobitosti specificirane od strane proizvođača tih komercijalno dostupnih restriksijskih enzima. Pogledaj, na primjer, New England Biolabs, Product Catalog. Ako je to željeno, odijeljivanje po veličini vezanih fragmenata se može izvesti pomoću elektroforeze na poliakrilamid gelu ili agarozu gelu korištenjem standardnih tehnika. Opći opis tehnike odijeljivanja po veličinama može se pronaći kod *Meth. Enzymol.* (1980) 65: 499-560. Bilo koja od brojnih metoda se koristi za uvođenje mutacija u kodirajuće sekvence kako bi se stvorile varijante ako se one trebaju proizvesti rekombinantno. Te mutacije uključuju jednostavne delecije ili insercije, sistematske delecije, insercije ili supstitucije nizova baza ili supstitucije jednostrukih baza. Modifikacije DNA sekvence su stvorene pomoću na određeno mjesto usmjerene mutageneze, koja je dobro poznata tehnika za koju su na tržištu komercijalno dostupni protokoli i reagensi (Zoller *et al.*, *Nucleic Acids Res.* **1982**, 10 : 6487-6500 i Adelman *et al.*, *DNA* **1983**, 2 : 183-193). Izolirana DNA je analizirana pomoću restrikcije i/ili je sekvencionirana pomoću dideoksi nukleotid metode po Sanger-u, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1977**, 74: 5463) što je dalje opisano od strane Messing, *et al.*, *Nucleic Acids Res.* **1981**, 9 : 309, ili pomoću metode po Maxam *et al.*, *Meth. Enzymol.*, navedeno gore.

Vektorska se DNA može uvesti u stanice sisavca pomoću konvencionalnih tehnika kao što su suprecipitacija kalcijevim fosfatom ili kalcijevim kloridom, DEAE-dekstranom posredovana transfekcija, lipofekcija, ili elektroporacija. Prikladne metode za transformirajuće stanice domaćine mogu se naći u Sambrook *et al.* (navedeno gore) i drugim standardnim tekstovima. Kod fuzijskih ekspresijskih vektora, uvedeno je proteolitičko mjesto otcjepljivanja na spoju reporter grupe ciljnog proteina kako bi se omogućilo odijeljivanje ciljnih proteina od reporter grupe nakon pročišćavanja fuzijskog proteina. Proteolitički enzimi za takvo otcjepljivanje i njihove sekvence prepoznavanja uključuju faktor Xa, trombin i enterokinazu.

Terapeutske upotrebe

U skladu s izumom, spoj izuma i/ili njegove farmaceutske mješavine se daju pacijentu, preferira se čovjeku, koji pati od raka ili oblika bolesti karakterizirane angiogenezom. Spojevi izuma i/ili njihove farmaceutske mješavine mogu se koristiti za tretiranje ili sprječavanje raka ili neželjene angiogeneze.

Preferira se da rak kao pojam uključuje bilo koji vaskularizirani tumor, preferira se kruti tumor, uključujući, ali na taj način da nije time ograničen, karcinome pluća, grudi, jajnika, želuca, gušterače, grkljana/grla, jednjaka, testisa, jetre, podušne žlijezde, žučnog trakta, debelog crijeva, rektuma, grlića maternice, maternice, endometrija, bubrega, mokraćnog mjehura, prostate, štitne žlijezde, karcinome ljuskastih stanica, adenokarcinome, karcinome malih stanica, melanome, gliome, neuroblastome, sarkome (na primjer, angiosarkome, hondrosarkome)). Bolest karakterizirana neželjenom angiogenezom uključuje, ali na taj način da nije time ograničena, artritis, dijabetes, arteriosklerozu, arteriovenozne, nepravilnosti, neovaskularizaciju transplantata rožnice, odgođeno zacijeljivanje rana, dijabetičku retinopatiju, sa starošću povezanu makularnu degeneraciju, granulacije, opekotine, hemofilne zglobove, reumatoidni artritis, hipertrofirane ožiljke, neovaskularni glaukom, prijelome s pomakom, Osier Weber Sindrom, psorijazu, piogeni, granulom, retrolentalnu fibroplaziju, pterigij, sklerodermu, trahom, vaskularne adhezije, okularnu neovaskularizaciju, parazitske bolesti, hipertrofiju nakon operacije, inhibiciju rasta kose, makularnu degeneraciju (uključujući i vlažni i suhi tip), reumatoidni artritis i osteoartritis.

Također se razmatraju metode za tretiranje pacijenta koji ima bolest ili stanje povezano s neželjenom migracijom stanica, invazijom ili proliferacijom, a koje uključuju davanje subjektu terapijski učinkovite količine spoja izuma i/ili njegove farmaceutske mješavine. Kod gore spomenutih metoda, pacijent ima tumor, a inhibicija angiogeneze rezultira smanjenjem veličine ili brzine rasta tumora ili razaranjem tumora. Preferira se da je subjekt čovjek.

Drugi primjeri bolesti ili stanja protiv kojih gornje metode mogu biti učinkovite uključuju primarni rast krutih tumora, leukemiju ili limfom, invaziju tumora, metastazu ili rast tumorskih metastaza; benignu hiperplaziju; aterosklerozu, miokardijalnu angiogenezu; vaskularnu restenozu nakon angioplastike pomoću balona, stvaranje neointime nakon vaskularne traume, restenozu vaskularnog transplantata, popratno koronarni rast ("coronary collateral formation"), trombozu dubokih vena, angiogenezu ishemičnog ruba; telangiektaziju, piogeni granulom, bolest rožnice, rubeozu, neovaskularni glaukom, dijabetičku i drugačiju retinopatiju, retrolentalne fibroplazije, dijabetičku neovaskularizaciju, makularnu degeneraciju, endometriozu, artritis, fibrozu povezanu s kroničnim upalnim stanjima, traumatsku ozljedu kičmene moždine uključujući ishemiju, stvaranje ožiljaka ili fibrozu, fibrozu pluća, kemoterapijom potaknutu fibrozu; zacijeljivanje rana sa stvaranjem ožiljaka i fibroze, čireve želuca, prijelom kostiju, keloide, ili poremećaj vaskulogeneze, hematopoeze, ovulacije, menstruacije, trudnoće ili placentacije povezan s invazijom patogenih stanica ili s angiogenezom.

Preferira se da bolest ili uvjet kojeg treba tretirati pomoću gore opisanih metoda predstavljaju rast, invaziju ili metastazu tumora, osobito tumora mozga. Primjeri takvih tumora mozga su astrocitom, anaplastični astrocitom, glioblastom, glioblastoma multiformae, pilocitički astrocitom, pleiomorfni ksantocitom, astrocitom subependimalnih gigantskih stanica, fibrilarni astrocitom, gemistocitički astrocitom, protoplazmički astrocitom, oligodendrogliom, anaplastički oligodendrogliom, ependimom, anaplastički ependimom, mikropapilarni ependimom, subependimom, miješani oligoastrocitom i maligni oligoastrocitom.

Gore spomenute metode mogu se također koristiti za tretiranje bolesti maternice kao što su endometrioza i patogena okularna neovaskularizacija povezana s, ili kao uzrok, proliferativne dijabetičke retinopatije, neovaskularna sa starošću povezana makularna degeneracija, precuranjna retinopatija, retinopatija srpastih stanica ili okluzija rožnične vene.

Nadalje, u određenim aspektima, spojevi izuma i/ili njihove farmaceutske mješavine se daju pacijentu, preferira se čovjeku, kao preventivna mjera protiv raznih bolesti ili poremećaja karakteriziranih neželjenom angiogenezom, uključujući rak. Tako se spojevi izuma i/ili njihove farmaceutske mješavine mogu davati kao preventivna mjera pacijentu koji ima predispoziciju za bolest karakteriziranu neželjenom angiogenezom. U skladu s time, spojevi i/ili farmaceutske mješavine izuma se mogu koristiti za sprječavanje jedne bolesti ili poremećaja te istovremeno tretiranje druge (na primjer, sprječavanje artritisa dok se vrši tretiranje raka).

Prikladnost spojeva izuma i/ili njihovih farmaceutskih mješavina za tretiranje ili sprječavanje raznih bolesti ili poremećaja kao što je rak može se analizirati pomoću metoda opisanih ovdje i u struci. U skladu s time, unutar sposobnosti iskusnih stručnjaka nalazi se mogućnost analize i upotrebe spojeva izuma i/ili njihovih farmaceutskih mješavina za tretiranje ili sprječavanje bolesti ili poremećaja kao što je rak.

Dijagnostičke upotrebe i metode

Spoj izuma i/ili njegove farmaceutske mješavine se daju pacijentu, preferira se čovjeku, u dijagnostički učinkovitim količinama kako bi se dokazala ili prikazala bolest kao što su one popisane u odjeljku 5.6 gore. Nadalje, spojevi izuma i/ili njihove farmaceutske mješavine se mogu koristiti kako bi se dokazale ili prikazale bolesti ili stanja povezana s neželjenom migracijom, invazijom ili proliferacijom stanica kao što su one popisane gore u odjeljku 5.6 pomoću davanja subjektu dijagnostički učinkovite količine spoja izuma i/ili njegove farmaceutske mješavine.

Spojevi izuma mogu biti dijagnostički označeni te se mogu koristiti, na primjer, za detekciju stanične migracije, stanične invazije i stanične proliferacije. raspodijela spoja izuma za vrijeme i nakon vezanja može se pratiti *in vitro* ili *in vivo* korištenjem odgovarajuće metode za detekciju označivača. Dijagnostički označeni spojevi mogu se koristiti *in vivo* za dijagnozu i prognozu, na primjer, za prikaz skrivenih metastatskih žarišta ili za druge tipove *in situ* procijenjivanja. Za dijagnostičke primjene, spojevi izuma mogu uključiti vezane linker dijelove, koji su dobro poznati iskusnim stručnjacima.

In situ dokazivanje označenog spoja se može postići pomoću uzimanja histološkog uzorka iz subjekta i njegovim ispitivanjem pomoću mikroskopije pod odgovarajućim uvjetima kako bi se detektirao označivač. Uobičajeno iskusni stručnjaci će odmah shvatiti da se bilo koja od širokog raspona histoloških metoda (kao što su postupci bojanja) može modificirati s ciljem da se postigne takvo *in situ* dokazivanje.

Za dijagnostički *in vivo* radioprikaz, glavni činioc kod odabira radionuklida je tip instrumenta za dokazivanje koji je dostupan. Odabrani radionuklid mora biti određenog tipa raspada koji je detektabilan pomoću određenog instrumenta. Općenito se može koristiti bilo koja konvencionalna metoda za vizualizirani dijagnostički prikaz u skladu s ovim izumom. Drugi činioc kod odabira radionuklida za *in vivo* dijagnozu predstavlja njegov vijek poluraspada koji treba biti dovoljno dug tako da označivač ostaje detektabilan u vremenu najvećeg unosa od strane ciljnog tkiva, ali i dovoljno kratak tako da se minimalizira štetno zračenje po domaćina. u jednom preferiranom aspektu, radionuklid korišten za *in vivo* prikaz ne emitira čestice, ali proizvodi veliki broj fotona u rasponu od 140-200 keV, koji se mogu lako detektirati pomoću konvencionalnih gama kamera.

In vivo prikaz se može koristiti za detektiranje skrivenih metastaza koje se ne mogu promatrati pomoću drugih metoda. Spojevi ovog izuma se mogu koristiti u dijagnostičkim, prognostičkim ili istraživačkim postupcima u vezi s bilo kojim odgovarajućim stanicama, tkivom, organom ili biološkim uzorkom željene životinjske vrste. Namjera je da pojam "biološki uzorak" predstavlja bilo koji tekući ili drugi materijal izveden iz tijela normalnog ili bolesnog subjekta, kao što su krv, serum, plazma, limfa, urin, slina, suze, cerebrospinalna tekućina, mlijeko, amnijska tekućina, žuč, tekućina ascita, gnoj i slično. Također je uključen unutar značenja ovog pojma ekstrakt organa ili tkiva i tekućina iz kulture u kojoj su bile inkubirane bilo koje stanice ili pripraveci tkiva subjekta.

Korisne doze su definirane kao učinkovita količina spoja za određeno dijagnostičko mjerenje. Tako učinkovita količina označuje količinu koja je dovoljna da se može detektirati korištenjem odgovarajućeg sustava za dokazivanje, na primjer detektora za prikaz magnetskom rezonancijom (MRI), gama kamere, itd. Najmanja detektabilna količina će zavisiti o omjeru označenog spoja specifično vezanog za tumor (signal) i količine označenog spoja bilo vezanog nespecifično bilo nađenog slobodnog u plazmi ili u vanstaničnoj tekućini.

Količina mješavine koju se treba dati zavisi o odabranom spoju, bolesti ili stanju, načinu davanja, i procjeni iskusnog profesionalca za prikaz (imaging). Općenito, količina spoja potrebna za mogućnost detektiranja kod dijagnostičke upotrebe će varirati zavisno od uvjeta koje treba uzeti u obzir kao što su starost, uvjet, spol, i raspon bolesti kod pacijenta, kontraindikacije, ako ih ima, i druge varijable, te se treba podesiti od strane pojedinih liječnika ili dijagnostičara. Doziranje može varirati od 0.01 mg/kg do 100 mg/kg.

Terapeutsko / profilaktičko davanje

Spojevi izuma i/ili njihove farmaceutske mješavine se mogu prednosno koristiti u humanoj medicini. Kao što je prethodno opisano kod odjeljka 4.6 gore, spojevi izuma i/ili njihove farmaceutske mješavine su korisne za tretman ili sprječavanje raznih bolesti ili poremećaja kao što je rak.

Kada se koriste za tretiranje ili sprječavanje gore spomenutih bolesti ili poremećaja, spojevi izuma i/ili njihove farmaceutske mješavine se mogu davati ili primjenjivati pojedinačno, ili u kombinaciji s drugim sredstvima. Spojevi izuma i/ili njihove farmaceutske mješavine se mogu također davati ili primjenjivati pojedinačno, u kombinaciji s drugim farmaceutski aktivnim sredstvima (na primjer, druga sredstva protiv raka, druga antiangiogenična sredstva kao što su kelatori kao što je cink, penicilamin, tiomolibdat itd.), uključujući druge spojeve izuma.

Ovaj izum pruža metode tretmana i profilakse davanjem pacijentu terapijski učinkovite količine spoja i/ili farmaceutske mješavine izuma. Pacijent može biti životinja, više se preferira da je sisavac, a najviše se preferira da je čovjek.

Ovi spojevi i/ili farmaceutske mješavine izuma, mogu se davati oralno. Spojevi i/ili farmaceutske mješavine izuma mogu se također davati na bilo koji drugi prikladan način, na primjer, pomoću infuzije ili bolus injekcije, pomoću apsorpcije kroz površine epitela ili sluzokože (na primjer, sluznica usta, rektalna i intestinalna sluznica, itd.). Davanje može biti sistemsko ili lokalno. Razni sustavi izdavanja (na primjer, inkapsulacija u liposome, mikročestice, mikrokapsule, kapsule, itd.) se mogu koristiti za davanje spoja i/ili farmaceutske mješavine izuma. Metode davanja uključuju, ali na taj način da nisu time ograničene, intradermalno, intramuskularno, intraperitonealno, intravenozno, subkutano, intranazalno, epiduralno, oralno, davanje pod jezik, intranazalno, intracerebralno, intravaginalno, transdermalno, rektalno, pomoću inhalacije, ili lokalno, osobito u uši, nos, oči, ili na kožu. Određivanje preferiranog načina davanja se ostavlja na rasuđivanje liječnika, te će zavisiti djelomice o mjestu pojavljivanja medicinskog stanja. U većini slučajeva, davanje će rezultirati otpuštanjem spojeva i/ili farmaceutske mješavine izuma u krvotok.

U specifičnim aspektima, može biti poželjno davati jedan ili više spojeva i/ili farmaceutske mješavine izuma lokalno u područje kojem je potreban tretman. To se može postići, na primjer, ali ne na način da se time ograničava, pomoću lokalne infuzije za vrijeme operacije, lokalne primjene, na primjer, u vezi s pokrovom za ranu nakon operacije, pomoću injekcije, pomoću katetera, pomoću supozitorija, ili pomoću implantata, pri čemu je navedeni implantat izrađen od poroznog, neporoznog, ili želatinoznog materijala, uključujući membrane, kao što su sialastične membrane, ili vlakna. U jednom aspektu, davanje se može provesti pomoću izravne injekcije u mjesto (ili bivše mjesto) raka ili artritisa.

U određenim aspektima, može biti poželjno uvesti jedan ili više spojeva i/ili farmaceutske mješavine izuma u središnji živčani sustav na bilo koji prikladan način, uključujući intraventrikularno, intratekalno i epiduralno injektiranje. Intraventrikularno injektiranje se može izvesti pomoću intraventrikularnog katetera, na primjer, vezanog za spremnik, kao što je Ommaya spremnik.

Spoj i/ili farmaceutska mješavina izuma se mogu također davati izravno u pluća pomoću inhalacije. Za davanje pomoću inhalacije, spoj i/ili farmaceutska mješavina izuma se mogu prikladno davati u pluća pomoću brojnih različitih naprava. Na primjer, inhalator odmjerenih doza ("Metered Dose Inhaler - MDI"), koji koristi plastične spremnike (kanisteri) koji sadrže prikladni propelant koji vrije na niskoj temperaturi, (na primjer, diklordifluometan, triklorfluometan, diklortetrafluoretan, ugljikov dioksid ili bilo koji drugi prikladni plin) se može koristiti za izdavanje spojeva izuma izravno u pluća.

Alternativno se može koristiti naprava za inhaliranje suhog praha ("Dry Powder Inhaler - DPI") za davanje spoja i/ili farmaceutske mješavine izuma u pluća. DPI naprave tipično koriste mehanizam kao što je izbijanje plina kako bi stvorile oblak suhog praha unutar spremnika, koji se zatim može inhalirati od strane pacijenta. DPI naprave su također dobro poznate u struci. Populama varijacija je sustav DPI s višestrukom dozom ("MDDPI"), koji omogućuje izdavanje više od jedne terapijske doze. MDDPI naprave su dostupne od strane tvrtka kao što su AstraZeneca, GlaxoWellcome, IVAX, Schering Plough, SkyePharma and Vectura. Na primjer, kapsule i ulošci želatine za korištenje u inhalatoru ili insuflatoru mogu biti sastavljene tako da sadrže praškastu mješavinu spoja izuma i za te sustave prikladne praškaste osnove kao što je laktoza ili škrob.

Drugi tip naprave koja se može koristiti za izdavanje spoja i/ili farmaceutske mješavine izuma u pluća je raspršivač tekućine ("sprej") kojim opskrbljuje, na primjer, Aradigm Corporation, Hayward, CA. Sustavi raspršivača tekućine koriste izuzetno male otvore mlaznice kako bi tekuću formulu lijeka doveli u fizičko stanje aerosola koji se zatim može izravno inhalirati u pluća.

U jednom aspektu se za izdavanje spoja i/ili farmaceutske mješavine izuma u pluća koristi nebulizator. Nebulizatori stvaraju aerosole iz tekućih formulacija lijekova pomoću, na primjer, ultrazvučne energije kako bi se dobile fine čestice koje se mogu odmah inhalirati (pogledaj na primjer, Verschöyle *et al.*, *British J. Cancer*, **1999**, 80, Suppl. 2, 96, koji je

dokument ovdje uključen pomoću reference). Primjeri nebulizatora uključuju naprave kojima opskrbljuje Batelle Pulmonary Therapeutics (Columbus, OH) (pogledaj, Armer *et al.*, United States Patent No. 5,954,047; van der Linden *et al.*, United States Patent No. 5,950,619; van der Linden *et al.*, United States Patent No. 5,970,974).

- 5 U slijedećem aspektu za izdavanje spoja i/ili farmaceutske mješavine izuma u pluća se koristi, elektrohodinamička ("EHD") aerosolna naprava. EHD aerosolne naprave koriste električnu energiju kako bi tekuće otopine lijekova ili suspenzije dovele do stanja aerosola (pogledaj na primjer, Noakes *et al.*, United States Patent No. 4,765,539). Elektrokemijske značajke formulacije mogu biti važni čimbenici koji se mogu optimizirati kada se spoj i/ili farmaceutska mješavina izuma izdaje u pluća pomoću EHD aerosolne naprave te se takvo optimiziranje rutinski izvodi od strane
10 iskusnog stručnjaka. EHD aerosolne naprave mogu učinkovitije izdavati lijekove u pluća nego postojeće tehnike za izdavanje usmjereno na pluća.

- U slijedećem aspektu, spojevi i/ili farmaceutske mješavine izuma mogu se izdavati u vezikuli, osobito u liposomu (pogledaj Langer, 1990, *Science*, 249: 1527-1533; Treat *et al.*, u: "Liposomes in Therapy of Infectious Disease and Cancer," Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353-365 (1989); pogledaj općenito "Liposomes in
15 Therapy of Infectious Disease and Cancer," Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353-365 (1989)).

- U slijedećem aspektu, spojevi i/ili farmaceutske mješavine izuma mogu se izdavati pomoću sustava za produženo otpuštanje, preferira se oralni sustav za produženo otpuštanje. U jednom aspektu se mogu koristiti pumpe (Langer, navedeno gore; Sefton, 1987, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14: 201; Saudek *et al.*, 1989, *N. Engl. J Med.* 321: 574).
20

- U slijedećem aspektu, mogu se koristiti polimerni materijali (pogledaj "Medical Applications of Controlled Release," Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); "Controlled Drug Bioavailability," Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Langer *et al.*, 1983, *J Macromol. Sci. Rev. Macromol Chem.* 23: 61; Levi *et al.*, 1985, *Science* 228: 190; During *et al.*, 1989, *Ann. Neurol.* 25 : 351; Howard *et al.*, 1989, *J. Neurosurg.* 71: 105). U slijedećem aspektu, polimerni materijali se koriste za oralno izdavanje s produženim otpuštanjem. Preferirani polimeri uključuju natrijevu karboksimetilcelulozu, hidroksipropilcelulozu, hidroksipropilmetilcelulozu i hidroksietilcelulozu (najviše se preferira hidroksipropil metilceluloza). Drugi celulozni eteri koji se preferiraju su bili opisani od strane Alderman, *Int. J. Pharm. Tech. & Prod. Mfr.*, 1984, 5 (3) 1-9). Činioci koji utječu na otpuštanje lijeka su dobro poznati iskusnom stručnjaku te su bili opisani u struci (Bamba *et al.*, *Int. J. Pharm.*, 1979, 2, 307).
25
30

- U slijedećem aspektu se za oralno davanje s produženim otpuštanjem mogu koristiti enterički presvućeni pripravci. Preferirani materijali za presvlačenje uključuju polimere s topivošću koja je zavisna o vrijednosti pH (drugim riječima, pomoću pH kontrolirano otpuštanje), polimeri s malom ili o vrijednosti pH ovisnom brzinom bubrenja, otapanja ili erozije (drugim riječima, vremenski kontrolirano otpuštanje), polimeri koji se raspadaju pomoću enzima (drugim riječima, enzimima kontrolirano otpuštanje) i polimeri koji oblikuju čvrste slojeve koji se razaraju pomoću povećanja tlaka (drugim riječima, tlakom kontrolirano otpuštanje).
35

- U još jednom slijedećem aspektu za oralno davanje s produženim otpuštanjem koriste se osmotski sustavi izdavanja (Verma *et al.*, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2000, 26 : 695-708). U još jednom slijedećem aspektu za oralno izdavanje s produženim otpuštanjem koriste se OROS™ osmotske naprave (Theeuwes *et al.*, United States Patent No. 3,845,770; Theeuwes *et al.*, United States Patent No. 3,916,899).
40

- U još daljnjem aspektu, sustav za kontrolirano otpuštanje može se postaviti u blizinu cilja spojeva i/ili farmaceutske mješavine izuma, zahvaljujući čemu je potreban samo dio systemske doze (pogledaj, na primjer, Goodson, u: "Medical Applications of Controlled Release," navedeno gore, vol. 2, pp.115-138 (1984)). Drugi sustavi za kontrolirano otpuštanje koji su raspravljani kod Langer, 1990, *Science* 249 : 1527-1533 mogu se također koristiti.
45

50 **Farmaceutske mješavine**

- Farmaceutske mješavine izuma sadrže terapijski ili dijagnostički učinkovitu količinu jednog ili više spojeva izuma, preferira se u pročišćenom obliku, zajedno s prikladnom količinom farmaceutski prihvatljivog prijenosnika, kako bi pružile prikladan oblik ispravnog davanja pacijentu. Kada se daju pacijentu, za spojeve izuma i farmaceutski prihvatljive prijenosnike se preferira da su sterilni. Voda predstavlja preferirani prijenosnik kada se spojevi izuma daju intravenozno. Slane otopine i vodene otopine dekstroze i glicerola se također mogu koristiti kao takvi prijenosnici, osobito za otopine koje se injektiraju. Prikladni farmaceutski prijenosnici također uključuju ekscipijente kao što su škrob, glukoza, laktoza, saharoza, želatina, slad, riža, brašno, kreča, silika gel, natrijev stearat, glicerol monostearat, talk, natrijev klorid, suho obrano mlijeko, glicerol, propilen, glikol, voda, etanol i slično. Farmaceutske mješavine izuma, ako je to željeno, mogu također sadržavati manje količine okvašivača ili emulzificirajućih sredstava, ili pH pufera. Dodatno se mogu koristiti pomoćna sredstva, stabilizirajuća sredstva, zgušnjivači, lubrikanti i sredstva za bojenje.
55
60

Farmaceutske mješavine koje sadrže spoj izuma mogu se proizvesti pomoću konvencionalnog miješanja, otapanja, granuliranja, izradom dražeja, mrvljenjem, emulzificiranjem, inkapsuliranjem, hvatanjem ili postupcima liofiliziranja. Farmaceutske mješavine se mogu oblikovati na konvencionalni način korištenjem jedne ili više od fiziološki prihvatljivih nosivih tvari, razrijeđivača, ekscipijenta ili pomoćnih tvari, koje olakšavaju prorađu spojeva izuma u pripravke koji se mogu koristiti farmaceutski. Ispravna formulacija zavisi o odabranom načinu davanja.

Farmaceutske mješavine izuma mogu biti u obliku otopina, suspenzija, emulzije, tableta, pilula, peleta, kapsula, kapsula koje sadrže tekućine, prašaka, formulacija za produženo otpuštanje, supozitorija, emulzija, aerosola, sprejeva, suspenzija, ili u bilo kojem drugom obliku prikladnom za korištenje. U jednom aspektu, farmaceutski prihvatljiv prijenosnik predstavlja kapsulu (pogledaj na primjer, Grosswald *et al.*, United States Patent No. 5,698,155). Drugi primjeri prikladnih farmaceutskih prijenosnika su bili opisani u struci (pogledaj Remington's Pharmaceutical Sciences, Philadelphia College of Pharmacy and Science, 19th Edition, 1995).

Za lokalno davanje, spojevi izuma mogu biti oblikovani kao otopine, gelovi, pomasti, kreme, suspenzije, itd. kao što je dobro poznato u struci. Sistemske formulacije uključuju one stvorene za davanje pomoću injekcije, na primjer, subkutanim, intravenoznim, intramuskularnim, intratekalnim ili intraperitonealnim injektiranjem, kao i one stvorene za transdermalno, transmukozalno, oralno ili davanje u pluća. Sistemske formulacije se mogu izraditi u kombinaciji s daljnjim aktivnim sredstvom koje poboljšava mukocilijarni klirens sluznice dišnih puteva ili smanjuje viskoznost sluznice. Ta aktivna sredstva uključuju, ali na taj način da nisu time ograničena, blokatore natrijevih kanala, antibiotike, N-acetil cistein, homocistein i fosfolipide.

U jednom aspektu, spojevi izuma su formulirani u skladu s rutinskim postupcima kao farmaceutska mješavina prilagođena za intravenozno davanje ljudima. Tipično, spojevi izuma za intravenozno davanje su otopine u sterilnom izotoničnom vodenom puferu. Za injektiranje se spoj izuma može formulirati u vodene otopine, preferira se u fiziološki kompatibilne pufere kao što su Hanks-ova otopina, Ringer-ova otopina, ili pufer fiziološka slana otopina. Otopina može sadržavati sredstva za formuliranje kao što su suspendirajuća, stabilizirajuća i/ili dispergirajuća sredstva. Kada je to nužno, farmaceutske mješavine mogu također uključivati sredstva za poboljšanje topivosti. Farmaceutske mješavine za intravenozno davanje mogu opcionalno uključivati lokalni anestetik kao što je lignokain kako bi olakšao bol na mjestu injektiranja. Općenito, sastojci se isporučuju ili zasebno ili se miješaju zajedno u oblik jedinične doze, na primjer, kao liofilizirani prašak ili bezvodni koncentrat u hermetički zatvorenom spremniku kao što su ampule ili vrećice na kojima je naznačena količina djelatnog sredstva. Kada se spoj izuma daje pomoću infuzije, može se isporučiti, na primjer, s infuzijskom bocom koja sadrži u farmaceutskom stupnju sterilnu vodu ili slanu otopinu. Kada se spoj izuma daje injektiranjem, mogu se osigurati ampule sterilne vode za injektiranje ili slane otopine tako da se sastojci mogu miješati prije davanja.

Za transmukozalno davanje se u formulaciji koriste penetranti koji su odgovarajući s obzirom na barijeru koju trebaju proći. Takvi penetranti su općenito poznati u struci.

Farmaceutske mješavine za oralno izdavanje mogu biti u obliku tableta, pastila, vodenih ili uljnih suspenzija, granula, prašaka, emulzija, kapsula, sirupa, ili eliksira, na primjer. Farmaceutske mješavine za oralno davanje mogu sadržavati jedno ili više opcionalnih sredstava, na primjer, zaslađivače kao što su fruktoza, aspartam ili saharin; sredstva za poboljšavanje okusa kao što su pepermint, ulje zimele, ili sredstva za bojanje od trešnje i konzervanse, kako bi se pružio farmaceutski prikladan pripravak. Još k tome, kada se nalaze u obliku tablete ili pilule, mješavine mogu biti presvućene kako bi se odgodilo raspadanje i apsorpcija u gastrointestinalnom traktu, čime se osigurava produženo djelovanje kroz duži period vremena. Selektivno permeabilne membrane koje okružuju osmotski aktivni vodeći spoj su također prikladne za oralno davanje spojeva izuma. U tim potonjim platformama, tekućina iz okoline koja okružuje kapsulu se upija od strane vodećeg spoja, koji bubri kako bi istisnuo sredstvo ili mješavinu sredstva kroz otvor. Te platforme izdavanja mogu osigurati profil izdavanja, u osnovi, nultog reda ("zero order") kao suprotnost zaoštrenim profilima formulacija s otpuštanjem bez odlaganja. Materijali koji osiguravaju vremenski pomak otpuštanja, kao što su glicerol monostearat ili glicerol stearat također se mogu koristiti. Oralne mješavine mogu uključivati standardne prijenosnike kao što su manitol, laktoza, škrob, magnezijev stearat, natrijev saharin, celuloza, magnezijev karbonat, itd. Takvi prijenosnici su, preferira se, u skladu s farmaceutskim standardima.

Za oralne tekuće pripravke kao što su, na primjer, suspenzije, eliksiri i otopine, prikladne nosive tvari, ekscipijenti ili razrijeđivači uključuju vodu, slanu otopinu, alkilenglikol (na primjer, propilen glikol), polialkilen glikole (na primjer, polietilen glikol) ulja, alkohole, blago kisele pufere između pH 4 i pH 6 (na primjer, acetat, citrat, askorbat u koncentracijama od između približno 5.0 mM do približno 50.0 mM), itd. Dodatno se mogu dodati sredstva za poboljšavanje okusa, konzervansi, sredstva za bojenje, žučne soli, acilkarnitini i slično.

Za davanje u usta, farmaceutske mješavine mogu biti u obliku tableta, pastila, itd. formulirane na konvencionalni način.

Tekuće formulacije lijekova prikladne za korištenje s nebulizatorima i napravama za raspršivanje tekućine te EHD aerosolnim napravama će tipično uključivati spoj izuma s farmaceutski prihvatljivim prijenosnikom. Preferira se da farmaceutski prihvatljiv prijenosnik predstavlja tekućinu kao što su alkohol, voda, polietilen glikol ili perfluoruglik. Opcionalno se mogu dodati drugi materijal kako bi se izmijenile aerosolne značajke otopine ili suspenzije spojeva izuma. Preferira se da materijal predstavlja tekućine kao što su alkohol, glikol, poliglikol ili masna kiselina. Druge metode formuliranja tekućih otopina lijekova ili suspenzija prikladnih za korištenje u aerosolnim napravama su poznate iskusnim stručnjacima (pogledaj, na primjer, Biesalski, United States Patent No. 5,112,598; Biesalski, United States Patent No. 5,556,611).

Spoj izuma može također biti formuliran u rektalne ili vaginalne farmaceutske mješavine kao što su supozitoriji ili retencijski klistiri, na primjer, koji sadrže konvencionalne baze za supozitorije kao što su kokosov maslac ili druge gliceride.

Dodatno prethodno opisanim formulacijama, spoj izuma se može također formulirati kao "depo" pripravak. Takve duge djelujuće formulacije se mogu davati pomoću implantacije (na primjer, subkutano ili intramuskularno) ili pomoću intramuskularnog injektiranja. Tako, na primjer, spoj izuma se može formulirati s prikladnim polimernim ili hidrofobnim materijalima (na primjer kao emulzija u prihvatljivom ulju) ili smolama ionskim izmjenjivačima, ili neznatno topivim derivatima, na primjer, kao neznatno topiva sol.

Kada je spoj izuma kiseli, može biti uključen u bilo koju od gore opisanih formulacija kao slobodna kiselina ili farmaceutski prihvatljiva sol. Farmaceutski prihvatljive soli u biti zadržavaju djelovanje slobodne kiseline, mogu se pripremiti pomoću reakcije s bazama i nagnju većoj topivosti u vodenim i drugim protičkim otapalima od odgovarajućeg slobodnog kiselinog oblika.

Doze

Spoj izuma, ili njegove farmaceutske mješavine, će se općenito koristiti u količini učinkovitoj za postizanje željene svrhe. Za korištenje kod tretiranja ili sprječavanja bolesti ili poremećaja kao što je rak, spojevi strukturne formule (I) i/ili njihove farmaceutske mješavine, se daju ili primjenjuju u terapijski učinkovitoj količini. Za korištenje kod detektiranja bolesti ili poremećaja kao što je rak, spojevi strukturne formule (I) i/ili njihove farmaceutske mješavine, se daju ili primjenjuju u dijagnostički učinkovitoj količini.

Količina spoja izuma koja će biti učinkovita u tretmanu, sprječavanju ili dokazivanju određenog poremećaja ili stanja koji je ovdje objavljen, će zavisiti od prirode poremećaja ili stanja, te se može odrediti pomoću standardnih kliničkih tehnika poznatih u struci kao što je prethodno opisano. Dodatno se mogu izvesti *in vitro* ili *in vivo* analize kako bi pomogle odrediti optimalne raspone doziranja. Količina spoja izuma koja se daje će, naravno, zavisiti o, među drugim činiocima, subjektu koji se tretira, tjelesnoj masi subjekta, ozbiljnosti stanja, načinu davanja i procjeni odgovarajućeg liječnika.

Na primjer, doziranje se može isporučiti u farmaceutskoj mješavini pomoću jednostrukog davanja, pomoću višestrukog davanja ili kontroliranog otpuštanja. U jednom aspektu, spojevi izuma se isporučuju oralnim davanjem s produženim otpuštanjem. Preferira se da se, u tom aspektu, spojevi izuma daju dva puta dnevno (više se preferira jednom dnevno). Doziranje se može ponavljati s prekidima, može se pružiti samo ili u kombinaciji s drugim lijekovima te se može nastaviti koliko je god dugo potrebno za učinkoviti tretman oboljenja ili poremećaja.

Prikladni rasponi za oralno davanje su zavisni od jačine lijeka, ali se općenito nalaze približno između 0.001 mg i približno 200 mg spoja izuma po kilogramu tjelesne mase. Rasponi doziranja mogu biti odmah određeni pomoću metode poznate uobičajeno iskusnim stručnjacima.

Prikladni rasponi za doziranje kod intravenoznog (i. v.) davanja su približno od 0.01 mg do približno 100 mg po kilogramu tjelesne mase. Prikladni rasponi za doziranje kod intranazalnog davanja su općenito približno od 0.01 mg/kg tjelesne mase do približno 1 mg/kg tjelesne mase. Supozitoriji općenito sadrže približno od 0.01 miligrama do približno 50 miligrama spoja izuma po kilogramu tjelesne mase i uključuju djelatni sastojak u rasponu od približno 0.5% do približno 10% težine. Preporučena doziranja za intradermalno, intramuskularno, intraperitonealno, subkutano, epiduralno, zatim davanje pod jezik ili intracerebralno davanje su u rasponu od približno 0.001 mg do približno 200 mg po kilogramu tjelesne mase. Učinkovite doze mogu se ekstrapolirati iz krivulja doza/odgovor izvedenih iz sustava za *in vitro* ili ispitivanje na životinjskim modelima. Takvi životinjski modeli i sustavi su dobro poznati u struci.

Spojevi izuma su, preferira se, analizirani *in vitro* i *in vivo*, kao što je opisano gore, za željeno terapijsko, profilaktičko ili dijagnostičko djelovanje, prije upotrebe kod ljudi. Na primjer, *in vitro* analize se mogu koristiti kako bi se odredilo da li se davanje specifičnog spoja izuma ili kombinacije spojeva izuma preferira za tretiranje, sprječavanje ili dijagnostiku raka. Za spojeve izuma se može također pokazati da su učinkoviti i sigurni korištenjem sustava životinjskih modela.

Preferira se da će terapijski učinkovita doza spoja izuma, što je opisano ovdje, pružiti terapijsku dobrobit u biti bez da uzrokuje toksičnost. Slično tome, dijagnostički učinkovita doza spoja izuma, što je opisano ovdje, će pružiti dijagnostičku dobrobit u biti bez da uzrokuje toksičnost. Toksičnost spojeva izuma se može odrediti korištenjem standardnih farmaceutskih postupaka te se može odmah utvrditi od strane iskusnog stručnjaka. Omjer između toksičnog i terapijskog učinka doze predstavlja terapijski indeks. Spoj izuma će, preferira se, prikazati osobito visoke terapijske indekse kod tretiranja bolesti i poremećaja. Doziranje spoja izuma opisanih ovdje će, preferira se, biti unutar raspona koncentracija u cirkulaciji koje uključuju učinkovitu terapijsku ili dijagnostičku dozu s malo ili bez toksičnosti.

Kombinacijska terapija

U određenim aspektima ovog izuma, spojevi i/ili farmaceutske mješavine izuma mogu se koristiti u kombinacijskoj terapiji s najmanje jednim drugim terapijskim sredstvom. Spoj i/ili farmaceutska mješavina izuma i terapijsko sredstvo mogu djelovati zbrojno ili, što se više preferira, sinergistički. U jednom aspektu, spoj i/ili farmaceutska mješavina izuma se daje istodobno s davanjem drugog terapijskog sredstva, koje može biti dio iste farmaceutske mješavine ili različite farmaceutske mješavine. U slijedećem aspektu, farmaceutska mješavina izuma se daje prije ili nakon davanja drugog terapijskog sredstva.

Posebno, u jednom preferiranom aspektu, spojevi i/ili farmaceutske mješavine izuma se mogu koristiti u kombinacijskoj terapiji s drugim kemoterapijskim sredstvima (na primjer, alkilirajuća sredstva (na primjer, dušikovi mustardi (na primjer, ciklofosfamid, ifosfamid, meklorektamin, melfalen, klorambucil, heksametilmelamin, tiotepa), alkil sulfonat (na primjer, busulfan), nitrozouree, triazini), antimetabolite (na primjer, analozi folne kiseline, analozi pirimidina (na primjer, fluoruracil, floksuridin, citozin arabinozid, itd.), analozi purina (na primjer, merkaptopurin, tioguanin, pentostatin, itd.), prirodni proizvodi (na primjer, vinblastin, vinkristin, etopozid, tercipozid, daktinomycin, daunorubicin, doksurubicin, bleomicin, mitomicin, mitomicin C, L-asparaginaza, interferon alfa), kompleksi koordinirani platinom (na primjer, *cis*-platina, karboplatin, itd.), mitoksantron, hidroksiurea, prokarbazin, hormoni i antagonisti (na primjer, prednizon, hidroksiprogesteron kaproat, medroksiprogesteron acetat, megestrol acetat, dietilstilbestrol, etinil estradiol, tamoksifen, testosteron propionat, fluoksimesteron, flutamid, leuprolid, itd.), protuangiogenična sredstva ili inhibitori (na primjer, angiostatin, retinske kiseline i paklitaksel, derivati estradiola, derivati tiazolopirimidina, itd.), sredstva koja potiču apoptozu (na primjer, protusmisleni nukleotidi koji blokiraju onkogene koji inhibiraju apoptozu, tumorski supresori, TRAIL, TRAIL polipeptid, s Fas-om povezani faktor 1, enzim koji prevodi interleukin-1, inhibitori fosfotirozina, agonisti RXR retinoidnog receptora, derivati karbostirila, itd.) i kelatori (penicilamin, cink, trientin, itd.)).

Terapijski kompleti

Ovaj izum pruža terapijske komplete koji sadrže spojeve izuma ili farmaceutske mješavine izuma. Terapijski kompleti mogu također sadržavati druge spojeve (na primjer, kemoterapijska sredstva, prirodne proizvode, hormone ili antagoniste, antiangiogenična sredstva ili inhibitore, sredstva koja potiču apoptozu ili kelatore) ili farmaceutske mješavine tih drugih spojeva.

Terapijski kompleti mogu imati jednostruke spremnike koji sadrže spoj izuma ili farmaceutske mješavine izuma sa ili bez drugih sastojaka (na primjer, drugi spojevi ili farmaceutske mješavine tih drugih spojeva) ili mogu imati zasebni spremnik za svaki sastojak. Preferira se da terapijski kompleti izuma uključuju spoj i/ili farmaceutsku mješavinu izuma spakiranu za korištenje u kombinaciji sa sudavanjem drugog spoja (preferira se kemoterapijskog sredstva, prirodnog proizvoda, hormona ili antagonista, protuangiogeničnog sredstva ili inhibitora, sredstva koje potiče apoptozu ili kelatora) i/ili njegove farmaceutske mješavine. Sastojci kompleta mogu biti predkompleksirani ili svaki sastojak može biti u odvojenom zasebnom spremniku prije davanja pacijentu.

Sastojci kompleta se mogu pružiti u jednoj ili više tekućih otopina, preferira se vodena otopina, više se preferira sterilna vodena otopina. Sastojci kompleta se mogu također pružiti kao krutine, koje se mogu prevesti u tekućine pomoću dodavanja prikladnih otapala, koji su, preferira se, pruženi u drugom zasebnom spremniku.

Spremnik terapijskog kompleta može biti epruveta, ispitna cjevčica, tikvica, boca, siringa, ili se tekućina ili krutina mogu spremati na bilo koji drugi način. Obično kada postoji više od jednog sastojka, komplet će sadržavati drugu epruvetu ili drugi spremnik, koji omogućuje zasebno doziranje. Komplet može također sadržavati drugi spremnik za farmaceutski prihvatljivu tekućinu.

Preferira se da će terapijski komplet sadržavati oruđe i instrumente (na primjer, jednu ili više igala, siringe, kapaljke za oči, pipetu, itd.), koji će omogućiti davanje sastojaka kompleta.

PRIMJERI

Izum je nadalje definiran upućivanjem na slijedeće primjere, koji detaljno opisuju pripravljalne spojeva izuma i metode za analiziranje biološkog djelovanja. Biti će očito iskusnim stručnjacima da se mogu izvesti mnoge modifikacije, i materijala i metoda bez da se udaljava od područja izuma.

U donjim primjerima slijedeće kratice imaju slijedeća značenja. Ako kratica nije definirana, onda ima svoje općenito prihvaćeno značenje.

AcCN	=	acetonitril
Boc	=	<i>tert</i> -butiloksikarbonil
CPM	=	zbroj po minuti
DMF	=	N,N-dimetilformamid
DMSO	=	dimetilsulfoksid
Fmoc	=	9-fluorenilmetiloksikarbonil
g	=	gram
h	=	sat
HBTU	=	O-Benzotriazol, N, N, N, N, tetrametil uronij heksafluor fosfat
HBSS	=	Hank-ova puferirana slana otopina
HOBt	=	N-hidroksibenksotriazol
HPLC	=	tekuća kromatografija pod visokim tlakom
L	=	litra
LC/MS	=	tekuća kromatografija/masena spektroskopija
M	=	molaro
min	=	minuta
mL	=	mililitar
mmol	=	milimol
NHS	=	N-hidroksisukcinimid
NMM	=	N-metil morfolin
TFA	=	trifluorocetna kiselina
TIS	=	triizopropilsilan
TLC	=	kromatografija tankog sloja
μL	=	mikrolitar
μM	=	mikromolarno
v/v	=	volumena u volumenu

Primjer 1: Standardno vezanje amino kiselina vezanih na smolu

"Rink Amide AM" smola (Novabiochem) je bila tretirana s 20%-tnim piperidinom u DMF-u (1 mL po 100 mg smole) kroz tri minute uz tresenje dušikom ili vibriranje te je reakcijska mješavina bila filtrirana. Taj je korak bio ponavljan dodatna dva puta. Smola je bila isprana tri puta s DMF-om, tri puta s metanolom i tri puta s diklormetanom. Željena, pomoću Fmoc zaštićena, tritilirana amino kiselina (BOC ili iVDc su bili korišteni za lizin, a *t*-Bu je bio korišten za tirozin) (3 ekv.), HBTU (3 ekv.), i HOBt (3 ekv.) su bili otopljeni u DMF-u (1 mL po 100 mg smole) i dodani gore navedenoj smoli, nakon čega je slijedilo dodavanje *N*-Metilmorfolina (NMM) (6 ekv.) te je mješavina bila tresena kroz 1 sat. Reakcijska je mješavina bila filtrirana, a smola je bila isprana s DMF-om. Taj korak vezanja je bio ponavljan te je zatim smola bila isprana s DMF-om tri puta, s MeOH tri puta i s DCM tri puta. Smola je bila tretirana s 20%-tnim piperidinom u DMF-u (3 x 3 minute svaka) kao što je opisano gore kako bi se uklonila Fmoc grupa na prvoj amino kiselini. Slijedeća željena, pomoću Fmoc zaštićena, tritilirana amino kiselina (3 ekv.), HBTU (3 ekv.), i HOBt (3 ekv.) su bili otopljeni u DMF-u (1 mL po 100 mg smole) i dodani u gore navedenu smolu, nakon čega je slijedilo dodavanje *N*-Metilmorfolina (NMM) (6 ekv.) te je mješavina bila tresena kroz 1 sat. Reakcijska je mješavina bila filtrirana, a smola je bila isprana s DMF-om tri puta, s MeOH tri puta i s DCM tri puta. Slijedeće amino kiseline su bile pojedinačno vezane na slični način. Za peptide koji sadrže N-terminalni acetyl, bile su korištene slijedeće komercijalno dostupne amino kiseline, Ac-Pro-OH (3 ekv.) ili Ac-Tyr-OH (3 ekv.) i vezane s HBTU (3 ekv.), HOBt (3 ekv.) i NMM (6 ekv.) kroz jedan sat. Za sve je druge primjere zaštićivanje s kapicom na N-terminusu bilo izvedeno pomoću vezanja terminalnog amina na smolu s odgovarajućom kiselinom (3 ekv.), HBTU (3 ekv.), HOBt (3 ekv.) i NMM (6 ekv.). Potpuno sastavljen peptid zaštićen kapicom na N-terminusu, na "Rink Amide AM" smoli je bio tretiran s TFA/TIS/voda (95: 2.5 : 2.5, 1 mL po 100 mg smole) i tresen dušikom ili vibracijama kroz 1 sat. Reakcijska mješavina je bila filtrirana, smola je bila isprana s TFA/TIS/voda i s diklormetanom. Otapalo je bilo uklonjeno u vakuumu, a rezultirajući talog je bio trituiran tri puta s eterom.

Primjer 2: Pročišćavanje peptida

Sirovi peptid je bio otopljen u minimalnoj količini metanola i vode ili u par kapi ledene octene kiseline i vode te je bio pročišćen pomoću preparativne HPLC reverzne faze (Beckman) s "Phenomenex Synergi hydro-RP C18" stupcem (250mm x 21.2 mm). Peptid je bio eluiran korištenjem gradijenta od 3-100%-tnog B kroz 30 min uz brzinu toka od 20mL/min, pri čemu je otapalo A bila voda koja sadrži 0.1%-tnu trifluoroctenu kiselinu, a otapalo B je bio acetonitril koji sadrži 0.1%-tnu trifluoroctenu kiselinu. Dokazivanje je bilo izvedeno pri 220 ili 254 nm. Frakcije >95%-tno čiste s obzirom na analitičku HPLC analizu (Waters, "Phenomenex hydro RP" (250mm x 4.6mm kroz 40 minuta) korištenjem gradijenta 3-100%-tnog B su bile kombinirane, koncentrirane do volumena od približno 2-4 ml pomoću rotacijske evaporacije, i liofilizirane.

Primjer 3: Otcjepljivanje peptida sa smole

Smola je bila tretirana s 2%-tnim hidrazinom u DMF-u (1 mL po 100 mg smole) kroz tri minute tresenjem s dušikom ili vibriranjem, a reakcijska mješavina je bila filtrirana. Taj je korak je bi ponavljan dodatnih pet puta. Smola je bila isprana tri puta s DMF-om i tri puta s diklormetanom. Željena karboksilna kiselina (4 ekv.), HBTU (4ekv.) i HOBt (4 ekv.) su bili otopljeni u DMF-u (1 mL po 100 mg smole) i dodani u gornju smolu, nakon čega je slijedilo dodavanje *N*-metil morfolina (8 ekv.), te je mješavina bila tresena kroz 1 sat. Reakcijska mješavina je bila filtrirana, a smola je bila isprana tri puta s DMF-om i tri puta s diklormetanom. Smola je bila tretirana s TFA/TIS/voda (95: 2.5 : 2.5, 1 mL po 100 mg smole) i tresena s dušikom ili vibriranjem kroz 1 sat. Reakcijska mješavina je bila filtrirana, smola je bila isprana jednom s TFA/TIS/voda, tri puta s diklormetanom, te je filtrat bio koncentriran. Talog je bio trituriran četiri puta s dietil eterom.

Primjer 4: Vezanje peptida za doksorubicin

Željeni peptid (1 ekv.) i doksorubicin hidroklorid (0.6-0.7 ekv.) su bili otopljeni u DMF-u (0.05 M), a zatim su HOBt (1.2 ekv.) i diizopropiletilamin (4 ekv.) bili dodani crvenoj otopini. Reakcijska mješavina je bila miješana pri sobnoj temperaturi kroz 5 minuta, te je zatim bio dodan EDAC (1.2 ekv.). Reakcijska mješavina je bila miješana kroz 17 sati pri sobnoj temperaturi te je otapalo bilo uklonjeno u vakuumu.

Primjer 5: 4-Fluorbenzoil-Pro-His-Ser-Cys-Asn-NH₂

Ovaj je spoj bio pripravljen u skladu s postupkom iz Primjera 1 i 2, pri čemu se 4-fluorbenzojeva kiselina koristila umjesto amino kiseline. Količina od 10.4 mg (19%) je bila izolirana u obliku bijele, pahuljaste krutine: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 8.94-8.84 (m, 1H), 8.53-7.96 (m, 4H), 7.66-7.58 (m, 2H), 7.44-7.21 (m, 4H), 7.09 (d, *J* = 10.9 Hz, 2H), 6.92 (s, 1H), 5.09 (široka s, 1H), 4.72-4.65 (m, 1H), 4.52-4.31 (m, 4H), 3.70-3.48 (m, 6H, preklapanje s vršnim očitanjem vode), 3.07-2.72 (m, 4H), 2.22-2.08 (m, 1H), 1.93-1.75 (m, 3H); ES MS *m/z* (M+H)⁺ 678. 4.

Primjer 6: Ac-Pro-His-Ser-Cys(Me)-Asn-OH

Wang smola (397 mg, 1.00 mmol) je bila isprana tri puta s diklormetanom, tri puta s metanolom i tri puta s diklormetanom. Fmoc-Asn(trt)-OH (2.40 g, 4.02 mmol) i diizopropilkarbodiimid (0.625 mL, 4.01 mmol) su bili otopljeni u 4 mL diklormetana i 3 mL DMF-a pri temperaturi od 0°C i miješani kroz 20 minuta. Diklormetan je bio uklonjen u vakuumu, 3 mL DMF-a dodano otopini, a otopina dodana Wang smoli spomenutoj gore u ljevku od sinteriranog stakla. DMAP (49 mg, 0.40 mmol) u 1 mL DMF-a je bio dodan smoli te je mješavina bila tresena s dušikom kroz jedan sat. Mješavina je bila filtrirana, smola je bila isprana tri puta s DMF-om i tri puta s diklormetanom, te je postupak vezanja bio ponavljan izričito kao što je opisano gore. Ostatak amino kiseline je bio dodan korištenjem postupka iz Primjera 1, s izuzetkom toga da je vezanje Fmoc-Ser(trt)-OH i Fmoc-His(trt)-OH bilo izvedeno korištenjem 3 ekvivalenta amino kiseline, 3 ekvivalenta HBTU, 3 ekvivalenta HOBt, i 6 ekvivalenta NMM. Postupak iz Primjera 2 je bio korišten za otcjepljivanje i pročišćavanje peptida i priskrbio je 282 mg (46%) bijele krutine, i kao mješavinu dva spoja u omjeru od 83:17: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 8.97 (s, 1H), 8.46-8.27 (m, 2H), 8.25-8.15 (m, 1H), 7.98-7.87 (m, 1H), 7.40-7.35 (m, 2H), 6.93 (s, 1H), 4.79-4.60 (m, 1H), 4.56-4.47 (m, 2H), 4.39-4.25 (m, 2H), 3.66-3.60 (m, 3H, preklapanje s vršnim očitanjem vode), 3.22-3.12 (m, 2H), 3.05-2.94 (m, 1H), 2.91-2.82 (m, 1H), 2.68-2.41 (m, 3H, preklapanje s vršnim očitanjem DMSO-a), 2.07 (s, 3H), 2.00 (s, 3H), 1.91-1.65 (m, 4H); ES MS *m/z* (M+H)⁺ 613.4.

Primjer 7: Ac-Pro-His-Ser-Cys(Me)-Asn-Gly-Gly-Lys (4-fluorbenzoil)-NH₂

Trietilamin (17 μL, 0.12 mmol) je bio dodan u otopinu Ac-Pro-His-Ser-Cys(Me)-Asn-Gly-Gly-Lys-NH₂ (21 mg, 0.024 mmol) i 4-fluorbenzoil suksinimida (6.2 mg, 0.026 mmol) u 1 mL DMF-a te je otopina bila miješana pri sobnoj temperaturi kroz 3.5 sata. Reakcijska mješavina je bila koncentrirana, a talog je bio pročišćen pomoću preparativne HPLC (3 do 100%-tna acetonitril-voda kroz 30 minuta) kako bi se dobilo 17 mg (71%) bijele pahuljaste krutine: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 8.98 (s, 1H), 8.49-8.42 (m, 1H), 8.35-8.22 (m, 3H), 8.14-8.07 (m, 2H), 7.94-7.87 (m, 3H), 7.82 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.46 (s, 1H), 7.40-7.35 (m, 1H), 7.32-7.26 (m, 3H), 7.02 (s, 2H), 4.82-4.61 (m, 1H), 4.60-4.47 (m, 2H), 4.40-4.26 (m, 2H), 4.21-4.13 (m, 1H), 3.77-3.69 (m, 5H), 3.68-3.61 (m, 2H, preklapanje s vršnim

očitanjem vode), 3.27-3.14 (m, 5H, preklapanje s vršnim očitanjem vode), 3.05-2.95 (m, 2H), 2.91-2.83 (m, 1H), 2.72-2.55 (m, 3H, preklapanje s vršnim očitanjem DMSO-a), 2.08 (s, 3H), 2.01 (s, 3H), 1.92-1.65 (m, 5H), 1.61-1.46 (m, 3H), 1.38-1.24 (m, 2H); ES MS m/z (M+H)⁺ 976.7.

5 Primjer 8: 5-(& 6-)Karboksifluorescein-β-Ala-Pro-His-Ser-Cys-Asn-NH₂

Ovaj je spoj bio pripravljen od "Rink amide AM" smole (0.0584 mmol) u skladu s postupcima iz Primjera 1 i 2, s tom iznimkom da je vezanje Fmoc-Cys(trt)-OH bilo izvedeno korištenjem 3 ekvivalenta amino kiseline, 3 ekvivalenta HBTU, 3 ekvivalenta HOBt, i 6 ekvivalenta NMM, dok su vezanja Fmoc-Ser(trt)-OH, Fmoc-His(trt)-OH, Fmoc-Pro-OH te 5-(& 6-)karboksifluoresceina bila izvedena korištenjem 2 ekvivalenta kiseline, 2 ekvivalenta HBTU, 2 ekvivalenta HOBt, i 4 ekvivalenta NMM. Naslovni spoj (27 mg, 46%) je bio izoliran kao žuta, pahuljasta krutina, i kao mješavina dva spoja: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 10.38-10.04 (široka s, 1H), 8.98-8.92 (m, 1H), 8.90-8.68 (m, 1H), 8.48-8.41 (m, 1H), 8.35-8.18 (m, 2H), 8.18-8.04 (m, 2H), 8.02-7.96 (m, 1H), 7.66 (s, 0.5H), 7.42-7.33 (m, 2.5H), 7.10 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H), 6.95-6.90 (m, 1H), 6.70 (s, 2H), 6.62-6.51 (m, 4H), 4.76-4.57 (m, 1H), 4.51-4.25 (m, 4H), 3.05-2.92 (m, 2H), 2.85-2.71 (m, 3H), 2.69-2.60 (m, 1H), 2.58-2.54 (m, 1H), 2.47-2.37 (m, 2H), 2.09-1.70 (m, 5H); ES MS m/z (M+H)⁺ 985.6; Analitički izračunato za C₄₅H₄₈N₁₀O₁₄S: N, 14.22. Pronađeno: 10.54 (sadržaj peptida = 74%).

Primjer 9: Ac-Pro-His-Ser-Cys-Asn-Gly-Gly-Lys(4-fluorbenzoil)-NH₂

Ovaj je spoj bio pripravljen iz Ac-Pro-His(trt)-Ser (trt)-Cis(trt)-Asn(trt)-Gly-Gly-Lys(ivDde)-"Rink amide AM" smole (208 mg, punjenje od 0.32 mmol/g, 0.067 mmol) u skladu s Postupkom C. Produkt je bio otcijepljen i pročišćen u skladu s Postupkom B te se priskrbilo 28 mg (44%) naslovnog spoja kao pahuljasta, bijela krutina : ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 8.96 (s, 1H), 8.48-8.40 (m, 1H), 8.30-8.18 (m, 2H), 8.16-8.00 (m, 2H), 7.97-7.79 (m, 4H), 7.46-7.33 (m, 2H), 7.32-7.24 (m, 4H), 7.11 (s, 0.5H), 7.01 (s, 2H), 6.94 (s, 0.5H), 4.79-4.11 (m, 7H), 3.78-3.60 (m, 8H, preklapanje s vršnim očitanjem vode), 3.27-3.12 (m, 5H, preklapanje s vršnim očitanjem vode), 3.04-2.93 (m, 1H), 2.89-2.70 (m, 2H), 2.64-2.44 (m, 2H, preklapanje s vršnim očitanjem DMSO-a), 2.40-2.32 (m, 1H), 2.09-1.97 (m, 3H), 1.91-1.66 (m, 5H), 1.58-1.45 (m, 3H), 1.37-1.23 (m, 2H); ES MS m/z (M+H)⁺ 962.8.

Primjer 10: Ac-Tyr-Gly-Gly-Pro-His-Ser-Cys-Asn-NH₂

Ovaj je spoj bio pripravljen iz "Rink amide AM" smole (0.100 mmol) u skladu s postupcima iz Primjera 1 i 2. Naslovni spoj (54 mg, 61 %) je bio izoliran kao bijela, pahuljasta krutina i kao mješavina dva spoja u omjeru 3 : 1: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 8.94 (s, 0.75H), 8.89 (s, 0.25H), 8.54-8.22 (m, 3H), 8.11 (t, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.98 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 7.84-7.78 (m, 1H), 7.41-7.32 (m, 2H), 7.10 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.05-6.99 (m, 2H), 6.92 (s, 1H), 6.63 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 4.79-4.55 (m, 13H, preklapanje s vršnim očitanjem vode), 4.49-4.30 (m, 7H, preklapanje s vršnim očitanjem vode), 4.03-3.84 (m, 2H), 3.83-3.58 (m, 4H), 3.55-3.47 (m, 1H), 3.44-3.25 (m, 1H), 3.22-3.09 (m, 1H), 3.06-2.72 (m, 4H), 2.69-2.55 (m, 1H), 2.47-2.38 (m, 2H, preklapanje s vršnim očitanjem DMSO-a), 2.09-1.96 (m, 1H), 1.93-1.82 (m, 2H), 1.77 (s, 4H); ES MS m/z (M+H)⁺ 875.7; Analitički izračunato za C₃₆H₅₀N₁₂O₁₂S: N, 19.21. Pronađeno: 12.90 (sadržaj peptida = 67%).

Primjer 11: Ac-Tyr-Gly-Gly-Gly-Gly-Pro-His-Ser-Cys-Asn-NH₂

Ovaj je spoj bio pripravljen iz "Rink amide AM" smole (0.100 mmol) u skladu s postupcima iz Primjera 1 i 2. Naslovni spoj (51 mg, 52%) je bio izoliran kao bijela, pahuljasta krutina, i kao mješavina dva spoja u omjeru 73: 27: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 8.94 (s, 0.73H), 8.88 (s, 0.27H), 8.56-8.21 (m, 3H), 8.18-8.01 (m, 4H), 7.99-7.87 (m, 2H), 7.40 (s, 1H), 7.37-7.33 (m, 1H), 7.10 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.02 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.92 (s, 1H), 6.64 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 4.78-4.26 (m, 26H, preklapanje s vršnim očitanjem vode), 4.03-3.85 (m, 3H, preklapanje s vršnim očitanjem vode), 3.81-3.58 (m, 8H), 3.55-3.46 (m, 1H), 3.21-3.10 (m, 1H), 3.05-2.71 (m, 4H), 2.69-2.56 (m, 1H), 2.51-2.38 (m, 2H, preklapanje s vršnim očitanjem DMSO-a), 2.05-1.95 (m, 1H), 1.92-1.82 (m, 2H), 1.77 (s, 4H); ES MS m/z (M+H)⁺ 989.7; Analitički izračunato za C₄₀H₅₆N₁₄O₁₄S: N, 19.83. Pronađeno: 14.52 (sadržaj peptida = 73%).

Primjer 12: Ac-Tyr-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Pro-His-Ser-Cys-Asn-NH₂

Ovaj je spoj bio pripravljen iz "Rink amide AM" smole (0.100 mmol) u skladu s postupcima iz Primjera 1 i 2. Naslovni spoj (37 mg, 33%) je bio izoliran kao bijela, pahuljasta krutina, i kao mješavina dva spoja u omjeru 63 : 37: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 8.94 (s, 0.63H), 8.88 (s, 0.37H), 8.55-8.20 (m, 3H), 8.17-7.86 (m, 7H), 7.40 (s, 1H), 7.37-7.32 (m, 1H), 7.10 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.02 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.92 (s, 1H), 6.63 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 4.76-4.59 (m, 3H, preklapanje s vršnim očitanjem vode), 4.50-4.30 (m, 6H), 4.03-3.85 (m, 2H), 3.81-3.69 (m, 8H), 3.68-3.58 (m, 2H), 3.55-3.47 (m, 2H), 3.43-3.10 (m, 2H), 3.04-2.70 (m, 4H), 2.68-2.55 (m, 2H), 2.47-2.37 (m, 2H, preklapanje s vršnim očitanjem DMSO-a), 2.05-1.94 (m, 1H), 1.92-1.81 (m, 2H), 1.77 (s, 4H); ES MS m/z (M+H)⁺ 1103.8; Analitički izračunato za C₄₄H₆₂N₁₆O₁₆S: N, 20.32. Pronađeno: 14.61 (sadržaj peptida = 72%).

Primjer 13: Ac-Tyr-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Pro-His-Ser-Cys-Asn-NH₂

Ovaj je spoj bio pripravljen iz "Rink amide AM" smole (0.100 mmol) u skladu s postupcima iz Primjera 1 i 2. Naslovni spoj (37 mg, 33%) je bio izoliran kao bijela, pahuljasta krutina, i kao mješavina dva spoja u omjeru 63 : 37: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 8.94 (s, 0.63H), 8.88 (s, 0.37H), 8.55-8.20 (m, 3H), 8.17-7.86 (m, 7H), 7.40 (s, 1H), 7.37-7.32 (m, 1H), 7.10 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.02 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.92 (s, 1H), 6.63 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 4.76-4.59 (m, 3H, preklapanje s vršnim očitajanjem vode), 4.50-4.30 (m, 6H), 4.03-3.85 (m, 2H), 3.81- 3.69 (m, 8H), 3.68-3.58 (m, 2H), 3.55-3.47 (m, 2H), 3.43-3.10 (m, 2H), 3.04-2.70 (m, 4H), 2.68-2.55 (m, 2H), 2.47-2.37 (m, 2H, preklapanje s vršnim očitajanjem DMSO-a), 2.05-1.94 (m, 1H), 1.92-1.81 (m, 2H), 1.77 (s, 4H); ES MS *m/z* (M+H)⁺ 1103.8; Analitički izračunato za C₄₄H₆₂N₁₆O₁₆S: N, 20.32. Pronađeno: 14.61 (sadržaj peptida = 72%).

Primjer 14: Ac-Tyr-NH-(CH₂)₄-CO-Pro-His-Ser-Cys-Asn-NH₂

Ovaj je spoj bio pripravljen iz "Rink amide AM" smole (0.103 mmol) u skladu s postupcima iz Primjera 1 i 2. Naslovni spoj (53 mg, 60%) je bio izoliran kao bijela, pahuljasta krutina, i kao mješavina dva spoja u omjeru 66 : 34: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 8.97 (s, 1H), 8.45-8.21 (m, 2H), 8.13 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 8.08-7.96 (m, 2H), 7.93-7.85 (m, 1H), 7.40 (s, 1H), 7.37-7.32 (m, 1H), 7.09 (d, *J* = 10.0 Hz, 2H), 7.02-6.95 (m, 2H), 6.92 (s, 1H), 6.63 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 4.79-4.59 (m, 4H, preklapanje s vršnim očitajanjem vode), 4.51-4.27 (m, 7H, preklapanje s vršnim očitajanjem vode), 3.72-3.56 (m, 2H), 3.54-3.28 (m, 2H), 3.21-3.10 (m, 1H), 3.07-2.94 (m, 3H), 2.88-2.72 (m, 3H), 2.65-2.55 (m, 1H), 2.46-2.38 (m, 2H, preklapanje s vršnim očitajanjem DMSO-a), 2.33-2.17 (m, 2H), 2.04-1.95 (m, 1H), 1.93-1.74 (m, 6H), 1.50-1.23 (m, 4H); ES MS *m/z* (M+H)⁺ 860.7; Analitički izračunato za C₃₇H₅₃N₁₁O₁₁S: N, 17.92. Pronađeno: 12.40 (sadržaj peptida = 69%).

Primjer 15: 3-(4-Hidroksifenil)propionil-NH-(CH₂)₄-CO-Pro-His-Ser-Cys-Asn-NH₂

Ovaj je spoj bio pripravljen iz "Rink amide AM" smole (0.103 mmol) u skladu s postupcima iz Primjera 1 i 2. Naslovni spoj (50 mg, 60%) je bio izoliran kao bijela, pahuljasta krutina, i kao mješavina dva spoja u omjeru 7 : 3: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 8.97 (s, 1H), 8.47-8.21 (m, 2H), 8.12 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 8.09-7.92 (m, 1H), 7.81-7.73 (m, 1H), 7.40 (s, 1H), 7.37-7.32 (m, 1H), 7.09 (d, *J* = 10.0 Hz, 2H), 6.99-6.89 (m, 3H), 6.64 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 4.78-4.59 (m, 2H), 4.51-4.27 (m, 6H, preklapanje s vršnim očitajanjem vode), 3.71-3.56 (m, 3H), 3.54-3.45 (m, 2H), 3.44-3.27 (m, 1H), 3.21-3.10 (m, 1H), 3.06-2.93 (m, 3H), 2.85-2.75 (m, 2H), 2.72-2.64 (m, 2H), 2.46-2.37 (m, 2H, preklapanje s vršnim očitajanjem DMSO-a), 2.32-2.21 (m, 4H), 2.08-1.95 (m, 1H), 1.90-1.69 (m, 3H), 1.52-1.23 (m, 4H); ES MS *m/z* (M+H)⁺ 803.6; Analitički izračunato za C₃₅H₅₀N₁₀O₁₀S: N, 17.45. Pronađeno: 12.86 (sadržaj peptida = 74%).

Primjer 16: Ac-Pro-His-Ser-Cys(Me)-Asn-Dox

Ovaj je spoj bio pripravljen iz Ac-Pro-His-Ser-Cys(Me)-Asn-OH (62 mg, 0.10 mmol) i doksorubicin hidroklorida (37 mg, 0.063 mmol) u skladu s postupkom iz Primjera 4. Rezultirajući talog je bio pročišćen u skladu s postupkom iz Primjera 2 te se priskrbio naslovni spoj (28 mg, 39%) kao pahuljasta, narandasta krutina: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 8.97-8.93 (m, 1H), 8.44-8.16 (m, 3H), 7.96-7.87 (m, 3H), 7.70-7.63 (m, 1H), 7.41-7.26 (m, 3H), 6.93-6.86 (m, 1H), 5.48-5.42 (m, 1H), 5.24-5.20 (m, 1H), 5.10-4.92 (m, 2H), 4.79-4.40 (m, 7H), 4.37-4.24 (m, 2H), 4.16-4.11 (m, 1H), 4.01-3.88 (m, 4H), 3.65-3.48 (m, 6H, preklapanje s vršnim očitajanjem vode), 3.25-3.11 (m, 2H), 3.06-2.91 (m, 3H), 2.86-2.70 (m, 1H), 2.67-2.55 (m, 2H, preklapanje s vršnim očitajanjem DMSO-a), 2.39-2.25 (m, 1H), 2.22-2.07 (m, 2H), 2.04 (s, 3H), 2.00 (s, 3H), 1.90-1.62 (m, 4H), 1.52-1.41 (m, 1H), 1.12 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H); ES MS *m/z* (M+H)⁺ 1138.5

Primjer 17: Ac-Pro-His-Ser-Cys(Ac)-Asn-Dox

Ovaj je spoj bio pripravljen iz Ac-Pro-His-Ser-Cys(Ac)-Asn-OH (52 mg, 0.081 mmol) i doksorubicin hidroklorida (33 mg, 0.057 mmol) u skladu s postupkom iz Primjera 3. Rezultirajući talog je bio pročišćen u skladu s postupkom iz Primjera 2 te se priskrbio naslovni spoj (36 mg, 54%) kao pahuljasta, narandasta krutina: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 8.95 (s, 1H), 8.44-8.10 (m, 3H), 7.96-7.85 (m, 2H), 7.96-7.62 (m, 1H), 7.40-7.28 (m, 2H), 6.90 (s, 1H), 5.46 (široka s, 1H), 5.32-5.21 (m, 1H), 4.98-4.92 (m, 1H), 4.76-4.12 (m, 8H), 4.00-3.88 (m, 3H), 3.07-2.73 (m, 5H), 2.38-2.26 (m, 1H), 2.28 (s, 3H), 2.22-2.06 (m, 2H), 2.00 (s, 3H), 1.91-1.63 (m, 5H), 1.52-1.42 (m, 1H); 1.13 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H), ES MS *m/z* (M+H)⁺ 1166.6.

Primjer 18: Ac-Pro-His-Ser-Cys(Me)-Asn-Gly-Gly-Lys(CO-(CH₂)₃-CO-Dox)-NH₂

Ac-Pro-His-Ser-Cys(Me)-Asn-Gly-Gly-Lys-NH₂ (74 mg, 0.087 mmol) i Fmoc-Dox-hemiglutarat (70%-tno čist, 74 mg, 0.059 mmol) su bili otopljeni u 3 mL DMF-a pri sobnoj temperaturi. HOBt (14 mg, 0.11 mmol) i diizopropiletilamin (60, μL, 0.34 mmol) su bili dodani u crvenu otopinu te je reakcijska mješavina bila miješana kroz 5 minuta. EDAC (21 mg, 0.11 mmol) je bio dodan u reakcijsku mješavinu i miješan dodatnih 18 sati. Otapalo je bilo uklonjeno u vakuumu, a

rezultirajuće crveno ulje je bilo trituirano tri puta s etil acetatom kako bi dalo crvenu krutinu. Crvena krutina je bila otopljena u 5 mL DMF-a i 500 μ L piperidina. Reakcijska mješavina je bila ohlađena na temperaturu od 0°C u ledenoj kupelji te je bila dodana mješavina 450 μ L TFA, 1.05 mL piridina i 3 mL DMF-a. Nakon 5 minuta, otapalo je bilo uklonjeno u vakuumu, a talog je bio trituiran jednom s etil acetatom i jednom s dietil eterom kako bi se dobila crvena krutina. Taj je produkt bio pročišćen u skladu s postupkom iz Primjera 2 te se priskrbio naslovni spoj (14 mg, 16%) kao pahuljasta, narandasta krutina: ES MS m/z (M+H)⁺ 1493.8.

Primjer 19: 2-Fluoracetil- β -Ala-Pro-His-Ser-Cys-Asn-NH₂

Ovaj je spoj bio pripremljen iz "Rink amide AM" smole (0.111 mmol) u skladu s postupcima iz Primjera 1 i 2. Naslovni spoj (30 mg, 40%) je bio izoliran kao bijela, pahuljasta krutina: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 8.98-8.93 (m, 1H), 8.43-8.21 (m, 2H), 8.15-8.07 (m, 2H), 8.01-7.90 (m, 1H), 7.41-7.32 (m, 2H), 7.09 (d, J = 9.9 Hz, 2H), 6.92 (s, 1H), 4.87-4.70 (m, 2H), 4.68-4.59 (m, 1H), 4.50-4.28 (m, 5H), 3.36-3.28 (m, 4H, preklapanje s vršnim očitanjem vode), 3.22-3.10 (m, 2H), 3.05-2.91 (m, 1H), 2.89-2.72 (m, 3H), 2.46-2.36 (m, 3H, preklapanje s vršnim očitanjem DMSO-a), 2.09-1.95 (m, 1H), 1.90-1.55 (m, 4H); ES MS m/z (M+H)⁺ 687.5; Analitički izračunato za C₂₆H₃₉FN₁₀O₉S: N, 0.40. Pronađeno: 14.89 (sadržaj peptida = 73%).

Primjer 20: Ac-Pro-His-Ser-Cys-Asn-Gly-Gly-Lys(2-fluoracetil)-NH₂

Ovaj je spoj bio pripremljen iz Ac-Pro-His(trt)-Ser(trt)-Cis(trt)-Asn(trt)-Gly-Gly-Lys(ivDde)-"Rink amide AM" smole (317 mg, punjenje od 0.32 mmol/g, 0.101 mmol) u skladu s postupkom iz Primjera 3. Produkt je bio pročišćen u skladu s postupkom iz Primjera 2 te se priskrbilo 21 mg (23%) naslovnog spoja kao pahuljasta, bijela krutina: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 8.97 (s, 1H), 8.45-8.17 (m, 3H), 8.16-8.01 (m, 3H), 7.95 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 7.80 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.45 (s, 1H), 7.41-7.33 (m, 1H), 7.27 (s, 1H), 7.01 (s, 2H), 4.74 (d, J = 47 Hz, 2H), 4.78-4.61 (m, 1H), 4.59-4.24 (m, 5H), 4.19-4.10 (m, 2H), 3.55-3.46 (m, 3H, preklapanje s vršnim očitanjem vode), 3.38-2.94 (m, 6H), 2.87-2.70 (m, 2H), 2.65-2.42 (m, 2H, preklapanje s vršnim očitanjem DMSO-a), 2.36 (t, J = 8.5 Hz, 1H), 2.00 (s, 3H), 1.90-1.61 (m, 5H), 1.56-1.36 (m, 3H), 1.31-1.15 (m, 2H); ES MS m/z (M+H)⁺ 900.8; Analitički izračunato za C₃₅H₅₄FN₁₃O₁₂S: N, 20.23. Pronađeno: 14.55 (sadržaj peptida = 72%).

Primjer 21: Ac-Pro-His-Ser-Cys-Asn-Gly-Gly-Lys(8-[(4'-fluorbenzil)amino]suberoil)-NH₂

Ovaj je spoj bio pripremljen iz Ac-Pro-His(trt)-Ser(trt)-Cis(trt)-Asn(trt)-Gly-Gly-Lys(ivDde)-"Rink amide AM" smole (312 mg, punjenje od 0.32 mmol/g, 0.0997 mmol) u skladu s postupkom iz Primjera 3. Produkt (42.3 mg sirovog materijala) je bio pročišćen u skladu s postupkom iz Primjera 2 te se priskrbilo 3.9 mg (11%) spoja PLG-107 kao pahuljasta, bijela krutina: ES MS m/z (M+H)⁺ 1104.0.

Primjer 22: Ac-Pro-His-Ser-Cys-Asn- β -Ala-Lys(3-(4-hidroksifenil)propionil)-NH₂

Ac-Pro-His(trt)-Ser(trt)-Cys(trt)-Asn(trt)- β -Ala-Lys(ivDde) je bio pripremljen na "Rink amide AM" smoli (0.100 mmol) u skladu s postupkom iz Primjera 1, ali nije bio otcijepljen sa smole. Naslovni spoj je bio pripremljen iz tog peptida vezanog za smolu u skladu s postupkom iz Primjera 3. Sirovi produkt je bio pročišćen u skladu s postupkom iz Primjera 2 i dobilo se 39 mg (41%) naslovnog spoja kao pahuljasta, bijela krutina: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 8.97 (s, 1H), 8.46-8.26 (m, 1H), 8.21 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 8.13 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 8.07-7.87 (m, 2H), 7.77-7.66 (m, 2H), 7.40 (s, 1H), 7.36-7.28 (m, 2H), 6.99-6.88 (m, 4H), 6.67-6.62 (m, 2H), 4.80-4.60 (m, 1H), 4.52-4.25 (m, 6H), 3.72-3.59 (m, 4H, preklapanje s vršnim očitanjem vode), 3.56-3.44 (m, 2H), 3.38-3.12 (m, 4H), 3.05-2.93 (m, 3H), 2.87-2.75 (m, 2H), 2.71-2.64 (m, 2H), 2.45-2.35 (m, 2H), 2.31-2.23 (m, 4H), 2.00 (s, 3H), 1.91-1.58 (m, 5H), 1.54-1.41 (m, 1H), 1.39-1.17 (m, 4H); ES MS m/z (M+H)⁺ 945.8; Analitički izračunato za C₄₁H₆₀N₁₂O₁₂S: N, 17.79. Pronađeno: 12.95 (sadržaj peptida = 73%).

Primjer 23: Ac-Pro-His-Ser-Cys-Asn-NH-(CH₂)₄-CO-Lys(3-(4-hidroksifenil)propionil)-NH₂

Ac-Pro-His(trt)-Ser(trt)-Cys(trt)-Asn(trt)-NH-(CH₂)₄-CO-Lys(ivDde) je bio pripremljen na "Rink amide AM" smoli (0.100 mmol) u skladu s postupkom iz Primjera 1, ali nije bio otcijepljen sa smole. Naslovni spoj je bio pripremljen iz tog na smolu vezanog peptida u skladu s postupkom iz Primjera 3. Sirovi produkt je bio pročišćen u skladu s postupkom iz Primjera 2 te se priskrbilo 34 mg (35%) naslovnog spoja kao pahuljasta, bijela krutina: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 8.97 (s, 1H), 8.45-8.19 (m, 2H), 8.13 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 8.04-7.92 (m, 1H), 7.81-7.71 (m, 2H), 7.66-7.59 (m, 1H), 7.40 (s, 1H), 7.35 (široka s, 1H), 7.29 (široka s, 1H), 6.96 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 6.93 (široka s, 2H), 6.64 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 4.81-4.60 (m, 2H), 4.53-4.24 (m, 8H, preklapanje s vršnim očitanjem vode), 3.72-3.60 (m, 3H, preklapanje s vršnim očitanjem vode), 3.56-3.46 (m, 2H), 3.39-3.25 (m, 1H), 3.24-3.11 (m, 1H), 3.07-2.92 (m, 5H), 2.84-2.72 (m, 2H), 2.71-2.63 (m, 2H), 2.46-2.36 (m, 2H, preklapanje s vršnim očitanjem DMSO-a), 2.30-2.24 (m, 2H), 2.16-2.07 (m, 2H), 2.00 (s, 3H), 1.91-1.55 (m, 5H), 1.53-1.16 (m, 9H); ES MS m/z (M+H)⁺ 973.8; Analitički izračunato za C₄₃H₆₄N₁₂O₁₂S: N, 17.27. Pronađeno: 11.42 (sadržaj peptida = 66%).

Primjer 24: Ac-Pro-His-Ser-Cys-Asn-NH-(CH₂)₆-CO-Lys(3-(4-hidroksifenil)propionil)-NH₂

Ac-Pro-His(trt)-Ser(trt)-Cys(trt)-Asn(trt)-NH-(CH₂)₆-CO-Lys(ivDde) je bio pripravljen na "Rink amide AM" smoli (0.100 mmol) u skladu s postupkom iz Primjera 1, ali nije bio otcijepljen sa smole. Naslovni spoj je bio pripravljen iz tog na smolu vezanog peptida u skladu s postupkom iz Primjera 3. Sirovi produkt je bio pročišćen u skladu s postupkom iz Primjera 2 te se priskrbilo 29 mg (29%) naslovnog spoja kao pahuljasta, bijela krutina : ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆)δ 9.12 (s, 1H), 8.91-8.82 (m, 1H), 8.43-8.26 (m, 2H), 8.03-7.97 (m, 1H), 7.94-7.83 (m, 1H), 7.79-7.71 (m, 2H), 7.41-7.20 (m, 3H), 6.96 (d, *J*= 8.5 Hz, 2H), 6.93-6.87 (m, 2H), 6.64 (d, *J*= 8.5 Hz, 2H), 5.09 (široka s, 1H), 4.80-4.57 (m, 1H), 4.48-4.39 (m, 1H), 4.36-4.20 (m, 3H), 4.19-4.09 (m, 1H), 3.69-3.53 (m, 4H), 3.04-2.88 (m, 7H), 2.73-2.63 (m, 3H), 2.45-2.33 (m, 3H, preklapanje s vršnim očitanjem DMSO-a), 2.29-2.23 (m, 3H), 2.12-2.05 (m, 3H), 1.99 (s, 3H), 1.91-1.56 (m, 5H), 1.51-1.12 (m, 13 H); ES MS *m/z* (M+H)⁺ 1002.1; Analitički izračunato za C₄₅H₆₈N₁₂O₁₂S: N, 16.79. Pronađeno: 10.78 (sadržaj peptida = 64%).

Primjer 25: Acetil-Pro-His-Ser-Cys-Asn-Tyr(3-jod)-NH₂

Ovaj je spoj bio pripravljen u skladu s postupcima iz Primjera 1 i 2 na koji je način dobiven naslovni spoj (32.9 mg, 16%) kao fini bijeli prašak. NMR podaci su naznačili mješavinu dvije vrste u omjeru od približno 80: 20: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆)δ 10.06 (s, 1 H), 8.96 (m, 1 H), 8.14-8.43 (m, 3 H), 7.88-8.05 (m, 2 H), 7.50 (d, 1H, *J*= 1.8 Hz), 7.40 (s, 3 H), 7.09 (bs, 1 H), 6.98-7.03 (m, 2 H), 6.75 (d, 1H, *J*= 8.4 Hz), 5.06 (bs, 1 H), 4.60-4.74 (m, 1 H), 4.47-4.54 (m, 1 H), 4.374.46 (m, 1 H), 4.22-4.36 (m, 3 H), 3.57-3.69 (m, 2 H), 3.47-3.55 (m, 2 H), 3.11-3.21 (m, 1 H), 2.86-3.04 (m, 3 H), 2.59-2.78 (m, 3 H), 2.35-2.43 (m, 1 H), 2.26-2.31 (t, 1H, *J*= 7.8 Hz), 2.00 (s, 3 H), 1.69-1.94 (m, 4H); MS *m/z* (C₃₂H₄₃IN₁₀O₁₀S+H)⁺ 887.4; Analitički izračunato za C₃₂H₄₃IN₁₀O₁₀S: N, 15.80. Pronađeno: N, 12.30 (sadržaj peptida: 78%).

Primjer 26: Acetil-Pro-His-Ser-Cys-Asn-Tyr(3,5-dijod)-NH₂

Ovaj je spoj bio pripravljen u skladu s postupcima iz Primjera 1 i 2 na koji je način dobiven naslovni spoj (25.0 mg, 11 %) kao fini bijeli prašak. NMR podaci su naznačili mješavinu dvije vrste u omjeru od približno 80: 20: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆)δ 9.32 (bs, 1 H), 8.94-8.95 (m, 1 H), 8.14-8.43 (m, 3 H), 7.91-8.04 (m, 2 H), 7.58 (s, 2 H), 7.34-7.42 (m, 3 H), 7.12 (s, 1 H), 6.98 (s, 1 H), 5.06 (bs, 1 H) 4.60-4.79 (m, 1 H), 4.39-4.53 (m, 2 H), 4.23-4.35 (3 H), 3.58-3.69 (m, 2 H), 3.47-3.54 (m, 2 H), 3.11-3.21 (m, 1 H), 2.56-3.07 (m, 7 H), 2.37-2.44 (m, 1 H), 2.29 (t, 1H, *J*= 9.7 Hz), 2.00 (s, 3 H), 1.68-1.90 (m, 4 H); MS *m/z* (C₃₂H₄₂I₂N₁₀O₁₀S+H)⁺ 1013.4; Analitički izračunato za C₃₂H₄₂I₂N₁₀O₁₀S: N, 13.83. Pronađeno: N, 11.26 (sadržaj peptida: 81 %).

Primjer 27: Acetil-Pro-His-Ser-Cys(metil)-Asn-Gly-Gly-Lys-NH₂

Ovaj je spoj bio pripravljen u skladu s postupcima iz Primjera 1, na koji je način dobiven naslovni spoj (151.2 mg, 44%) kao fini bijeli prašak. NMR podaci su naznačili mješavinu dvije vrste u omjeru od približno 80: 20: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆)δ 8.96-8.97 (m, 1 H), 8.24-8.46 (m, 3 H), 8.90 (app t, 2H), 7.79-7.95 (m, 2H), 7.65 (bs, 3 H), 7.45 (bs, 1 H), 7.34-7.39 (m, 1 H), 7.29 (bs, 1 H), 7.05 (bs, 1 H), 7.00 (bs, 1 H), 5.05 (bs, 1 H) 4.60-4.79 (m, 1 H), 4.47-4.58 (2 H), 4.25-4.40 (m, 2 H), 4.12-4.20 (m, 1H) 3.69-3.79 (m, 4 H), 3.60-3.66 (m, 3 H), 3.12-3.22 (m, 2 H), 2.94-3.04 (m, 1 H), 2.56-2.89 (m, 6H), 2.07 (s, 3 H), 2.00 (s, 3 H), 1.64-1.88 (m, 4 H), 1.46-1.58 (m, 3 H), 1.23-1.37 (m, 2 H); MS *m/z* (C₃₄H₅₅N₁₃O₁₁S+H)⁺ 854.7; Analitički izračunato za C₃₄H₅₅N₁₃O₁₁S: N, 21.32. Pronađeno: N, 14.88 (sadržaj peptida: 70%).

Primjer 28: 3-(4-Hidroksifenil)propionil-Pro-His-Ser-Cys-Asn-NH₂

Ovaj je spoj bio pripravljen u skladu s postupcima iz Primjera 1 i 2 uz slijedeće modifikacije: zaštićivanje kapićom na N-terminusu je bilo izvedeno korištenjem N-sukcinimidil-3-(4-hidroksifenil)propionata (4.0 ekv.) i TEA (12.0 ekv.). Naslovni spoj (43.0 mg, 38%) je bio izoliran kao fini bijeli prašak. NMR podaci su naznačili mješavinu dvije vrste u omjeru od približno 80: 20: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆)δ 9.12 (bs, 1 H), 8.87-8.95 (m, 1 H), 8.09-8.39 (m, 4 H), 7.97 (app d, 1 H), 7.39 (s, 1 H), 7.33 (bs, 1 H), 6.99-7.09 (m, 4 H), 6.90-6.92 (2 H), 6.61-6.66 (m, 2 H), 5.09 (bs, 1 H), 4.59-4.77 (m, 2 H), 4.27-4.46 (m, 5 H), 3.57-3.70 (m, 3 H), 3.12-3.19 (m, 1 H), 2.97-3.02 (m, 1 H), 2.66-2.80 (m, 4 H), 2.37-2.45 (m, 2 H), 1.63-2.30 (m, 5 H); MS *m/z* (C₃₀H₄₁N₉O₉S+H)⁺ 704.4; Analitički izračunato za C₃₀H₄₁N₉O₉S: N, 17.91. Pronađeno: N, 13.88 (sadržaj peptida: 77%).

Primjer 29: Acetil-Tyr(3,5-dijod)-Pro-His-Ser-Cys-Asn-NH₂

Ovaj je spoj bio pripravljen u skladu s postupcima iz Primjera 1 i 2 na koji je način dobiven naslovni spoj (48.8 mg, 29 %) kao fini bijeli prašak. NMR podaci su naznačili mješavinu dvije vrste u omjeru od približno 80: 20 : ¹H NMR (300 MHz, MeOD)δ 8.79 (m, 1 H), 8.26-8.46 (m, 1 H), 7.61-7.65 (m, 2 H), 7.42-7.47 (m, 1 H), 4.70-4.76 (m, 1 H), 4.52-4.56 (m, 1 H), 4.38-4.45 (m, 2H), 3.80-3.96 (m, 3 H), 3.59-3.67 (m, 1 H), 3.35-3.43 (m, 2 H), 3.17-3.27 (m, 1 H), 2.99-

3. 06 (m, 1 H), 2.93-2. 95 (m, 2 H), 2.65-2. 80 (m, 3 H), 1.99-2. 25 (m, 3H), 1.93-1. 96 (m, 3 H); MS m/z ($C_{32}H_{42}I_2N_{10}O_{10}S+H$)⁺ 1013.0; Analitički izračunato za $C_{32}H_{42}I_2N_{10}O_{10}S$: N, 13.83. Pronađeno: N, 11.33 (sadržaj peptida: 82%).

5 **Primjer 30: Acetil-Pro-His-Ser-Cys-Asn-βAla-Tyr(3-jod)-NH₂**

Ovaj je spoj bio pripremljen u skladu s postupcima iz Primjera 1 i 2 na koji je način dobiven naslovni spoj (8.1 mg, 6 %) kao fini bijeli prašak. NMR podaci su naznačili mješavinu dvije vrste u omjeru od približno 80: 20 : ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆)δ 10.07 (s, 1 H), 8.96 (m, 1 H), 8.11-8. 44 (m, 3 H), 7.94-8. 02 (m, 2 H), 7.68 (app t, 1 H), 7.54 (d, 1H, *J*= 2.1 Hz), 7.40-7. 41 (m, 2 H), 7.34 (m, 1H), 7.02-7. 05 (m, 2 H), 6.90 (bs, 1 H), 6.75 (d, 1H, *J*= 8.4 Hz), 5.09 (bs, 1 H), 4.60-4. 80 (m, 2 H), 4.26-4. 51 (m, 4 H), 3.59-3. 70 (m, 2 H), 3.47-3. 54 (m, 2 H), 3.11-3. 21 (m, 4 H), 2.72-3. 03 (m, 5 H), 2.56-2. 64 (m, 1 H), 2.36- 2. 43 (m, 2 H), 2.14-2. 29 (m, 3 H), 2.00 (s, 3 H), 1.67-1. 91 (m, 3 H); MS m/z ($C_{35}H_{48}IN_{11}O_{11}S+H$)⁺ 958. 5; Analitički izračunato za $C_{35}H_{48}IN_{11}O_{11}S$: N, 16.09. Pronađeno: N, 12.85 (sadržaj peptida: 80%).

15

Primjer 31: 3-(4-Hidroksi-3,5-dijodfenil)propionil-Pro-His-Ser-Cys-Asn- NH₂

Ovaj je spoj bio pripremljen u skladu s postupcima iz Primjera 1 i 2 uz slijedeće modifikacije: zaštićivanje kapičom na N-terminusu je bilo učinjeno pomoću izvođenja jednostrukog vezanja s 3-(4-hidroksifenil)propionskom kiselinom (3.0 ekv.). Naslovni spoj (23.9 mg, 23 %) je bio izoliran kao fini bijeli prašak. NMR podaci su naznačili mješavinu dvije vrste u omjeru od približno 80: 20: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆)δ 9.31 (bs, 1 H), 8.93- 8.97 (m, 1 H), 7.99-8. 44 (m, 4 H), 7.62 (m, 2 H), 7.41-7. 56 (m, 1 H), 7.34 (bs, 1 H), 7.09 (app d, 2 H), 6.92 (s, 1 H), 5.12 (bs, 1 H), 4.29-4. 78 (m, 6H), 3.59-3. 72 (m, 3 H), 3.14-3. 22 (m, 2 H), 2.96-3. 03 (m, 2 H), 2.77-2. 84 (m, 2 H), 2.65-2. 71 (m, 2 H), 2.39-2. 46 (m, 2 H), 1.56-2. 15 (m, 5 H); MS m/z ($C_{30}H_{39}I_2N_9O_9S+H$)⁺ 956.3; Analitički izračunato za $C_{30}H_{39}I_2N_9O_9S$: N, 13.19. Pronađeno: N, 10.84 (sadržaj peptida: 82%).

25

Primjer 32: Acetil-Tyr(3,5-dijod)-β-Ala-Pro-His-Ser-Cys-Asn-NH₂

Ovaj je spoj bio pripremljen u skladu s postupcima iz Primjera 1 i 2 uz slijedeću modifikaciju: izvedena su samo jednostruka vezanja s Fmoc-β-Ala-OH i Acetil-Tyr (3,5-dijod)-OH. Naslovni spoj je bio izoliran kao fini bijeli prašak (55.0 mg, 51 %). NMR podaci su naznačili mješavinu dvije vrste u omjeru od približno 80: 20: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆)δ 9.35 (bs, 1 H), 8.96 (m, 1 H), 8.22-8. 41 (m, 3 H), 7.97-8. 14 (m, 4 H), 7.60-7. 63 (m, 2 H), 7.39 (s, 1 H), 7.34 (bs, 1 H), 7.09 (app d, 2 H), 6.92 (s, 1 H), 4.60-4. 78 (m, 2 H), 4.28-4. 50 (m, 6 H), 3.59-3. 71 (m, 2 H), 2.94-3. 06 (m, 2 H), 2.72-2. 83 (m, 3 H), 2.38-2. 46 (m, 3 H), 1.76-2. 09 (m, 7 H); MS m/z ($C_{35}H_{47}I_2N_{11}O_{11}S+H$)⁺ 1084.5; Analitički izračunato za $C_{35}H_{47}I_2N_{11}O_{11}S$: N, 14.22. Pronađeno: N, 11.39 (sadržaj peptida: 80%).

35

Primjer 33: Acetil-Pro-His-Ser-Cys-Asn-β-Ala-Tyr(3,5-dijod)-NH₂

Ovaj je spoj bio pripremljen u skladu s postupcima iz Primjera 1 i 2 uz slijedeću modifikaciju: izvedena su samo jednostruka vezanja sa svakom amino kiselinom. Naslovni spoj je bio izoliran kao fini bijeli prašak (14.5 mg, 9 %). NMR podaci su naznačili mješavinu dvije vrste u omjeru od približno 80: 20 : ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆)δ 9.35 (bs, 1 H), 8.96 (m, 1 H), 7.94-8. 44 (m, 6 H), 7.68-7. 72 (m, 1 H), 7.62 (s, 2 H), 7.46 (bs, 1 H), 7.40 (bs, 1 H), 7.34 (bs, 1 H), 7.06 (bs, 1 H), 6.90 (bs, 1 H), 5.11 (bs, 1 H), 4.61- 4.80 (m, 6 H), 3.57-3. 71 (m, 2 H), 3.08-3. 22 (m, 3 H), 2.94-3. 07 (m, 2 H), 2.73-2. 86 (m, 4 H), 2.36-2. 43 (m, 2 H), 2.14-2. 30 (m, 3 H), 2.00 (s, 3 H), 1.68-1. 89 (m, 4 H); MS m/z ($C_{35}H_{47}I_2N_{11}O_{11}S$)⁺ 1084. 5; Analitički izračunato za $C_{35}H_{47}I_2N_{11}O_{11}S$: N, 14.22. Pronađeno: N, 11.64 (sadržaj peptida: 82%).

45

Primjer 34: Acetil-Tyr(3-jod)-Pro-His-Ser-Cys-Asn-NH₂

Ovaj je spoj bio pripremljen u skladu s postupcima iz Primjera 2 sa slijedećim modifikacijama: konačno vezanje amino kiseline je bilo provedeno s Ac-Tyr (3-jod)-OH (4 ekv.), HBTU (4 ekv.), HOBT (4 ekv.) i NMM (8 ekv.). Naslovni spoj je bio izoliran (7.7 mg, 16%) kao fini bijeli prašak. NMR podaci su naznačili mješavinu dvije vrste u omjeru od približno 75: 25 : ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆)δ 10.10-10. 17 (m, 1 H), 8.91-8. 97 (m, 1 H), 8.25-8. 52-m (2 H), 8.05-8. 15 (m, 2 H), 7.58 (d, 1H, *J*= 2.0 Hz), 7.35- 7.43 (m, 2 H), 7.09-7. 11 (m, 3 H), 6.92 (bs, 1 H), 6.75-6. 77 (m, 1 H), 5.11 (bs, 1 H), 4.55- 4.69 (m, 2 H), 4.33-4. 50 (m, 4 H), 3.49-3. 77 (m, 4 H), 3.17 (s, 2 H), 2.69-2. 85 (m, 4 H), 1.76-2. 07 (m, 6 H); MS m/z ($C_{32}H_{43}IN_{10}O_{10}S+H$)⁺ 887.5; Analitički izračunato za $C_{32}H_{43}IN_{10}O_{10}S$: N, 15.80. Pronađeno: N, 12.15 (sadržaj peptida: 77%).

55

Primjer 35: Acetil-Pro-His-Ser-Cys-Asn-Gly-Gly-Lys(3-(4-hidroksi-3,4-dijodfenil)propionil)-NH₂

60

Ovaj je spoj bio pripremljen u skladu s postupcima iz Primjera 3 i 2 sa slijedećim modifikacijama: stvaranje amida na lizinu je bilo provedeno s 3-(4-hidroksi-3,4-dijodfenil)propionskom kiselinom (4 ekv.), HBTU (4 ekv.), HOBT (4 ekv.)

i NMM (8 ekv.). Naslovni spoj je bio izoliran (16.2 mg, 13%) kao fini bijeli prašak. NMR podaci su naznačili mješavinu dvije vrste u omjeru od približno 75: 25 : ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 9.31 (bs, 1 H), 8.96 (m, 1 H), 8.19-8.44 (m, 3 H), 8.01-8.14 (m, 2 H), 7.95 (m, 1 H), 7.76-7.82 (m, 2 H), 7.55 (s, 2 H), 7.45 (s, 1 H), 7.34, 7.39 (s, 1 H), 7.27 (s, 1 H), 7.01 (s, 2 H), 5.09 (bs, 1 H), 4.61-4.77 (m, 1 H), 4.51-4.57 (m, 1 H), 4.26-4.37 (m, 2 H), 4.10-4.17 (m, 1 H), 3.62-3.74 (m, 5 H), 3.47-3.52 (m, 2 H), 2.94-3.02 (m, 5 H), 2.73-2.83 (m, 3 H), 2.64-2.69 (m, 3 H), 2.26-2.39 (m, 4 H), 2.00 (s, 3 H), 1.61-1.89 (m, 4 H), 1.44-1.56 (m, 1 H), 1.18-1.39 (m, 5 H); MS m/z ($\text{C}_{42}\text{H}_{59}\text{I}_2\text{N}_{13}\text{O}_{13}\text{S}+\text{H}$) $^+$ 1240.7; Analitički izračunato za $\text{C}_{42}\text{H}_{59}\text{I}_2\text{N}_{13}\text{O}_{13}\text{S}$: N, 14.69. Pronađeno: N, 12.28 (sadržaj peptida: 84%).

Primjer 36: 3-(4-Hidroksi-3,5-dijodfenil)propionil- β -Ala-Pro-His-Ser-Cys-Asn-NH₂

Ovaj je spoj bio pripravljen u skladu s postupcima iz Primjera 1 i 2 uz slijedeću modifikaciju: zaštićivanje kapićom na N-terminusu je bilo izvedeno korištenjem 3-(4-hidroksi-3,5-dijodfenil)propionske kiseline (4.0 ekv.), HBTU (4.0 ekv.), HOBT (4.0 ekv.) i NMM (8.0 ekv.). Naslovni spoj (23.3 mg, 32 %) je bio izoliran kao fini bijeli prašak. NMR podaci su naznačili mješavinu dvije vrste u omjeru od približno 80: 20: ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 9.32 (bs, 1 H), 8.95 (s, 1 H), 8.22-8.42 (m, 2 H), 8.11-8.13 app d, 1 H), 7.97-7.99 (app d, 1 H), 7.81-7.87 (m, 1 H), 7.56 (s, 2 H), 7.35-7.39 (m, 2 H), 7.08-7.11 (app d, 2 H), 6.92 (s, 1 H), 5.12 (bs, 1 H), 4.60-4.78 m (m, 1 H), 4.27-4.50 (m, 5 H), 3.59-3.70 (m, 3 H), 2.94-3.02 (m, 1 H), 2.76-2.83 (m, 2 H), 2.65-2.69 (m, 2 H), 2.28-2.46 (m, 6 H), 1.72-2.09 (m, 4 H); MS m/z ($\text{C}_{33}\text{H}_{44}\text{I}_2\text{N}_{10}\text{O}_{10}\text{S}+\text{H}$) $^+$ 1027.5; Analitički izračunato za $\text{C}_{33}\text{H}_{44}\text{I}_2\text{N}_{10}\text{O}_{10}\text{S}$: N, 13.64. Pronađeno: N, 10.85 (sadržaj peptida: 80%).

Primjer 37: Acetil-Pro-His-Ser-Cys-Asn-Gly-Gly-Lys(5- i 6-karboksifluorescein)-NH₂

Ovaj je spoj bio pripravljen u skladu s postupcima iz Primjera 2 i 3 sa slijedećim modifikacijama: stvaranje amida na lizinu je bilo provedeno s 5-(i 6) karboksifluoresceinom (3 ekv.), HBTU (3 ekv.), HOBT (3 ekv.) i NMM (6 ekv.). Naslovni spoj je bio izoliran (10.5 mg, 18%) kao fini bijeli prašak. NMR podaci su naznačili mješavinu izomera: ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 10.16 (s, 1 H), 8.78-8.92 (m, 1 H), 8.44, 8.68 (m, m, 1 H), 8.05-8.28 (m, 3 H), 7.79-7.96 (m, 1 H), 7.45, 7.66 (s, s, 1 H), 7.25-7.37 (m, 2 H), 6.97-7.02 (m, 2 H), 6.69 (m, 1 H), 6.52-6.59 (m, 2 H), 5.08 (bs, 1 H), 4.06-4.80 (m, 8 H), 2.24-2.31, 1.99 (m, s, 3 H), 1.67-1.92 (m, 2 H), 1.23-1.59 (m, 3 H); MS m/z ($\text{C}_{54}\text{H}_{63}\text{N}_{13}\text{O}_{17}\text{S}+\text{H}$) $^+$ 1198.7; Analitički izračunato za $\text{C}_{54}\text{H}_{63}\text{N}_{13}\text{O}_{17}\text{S}$: N, 15.20. Pronađeno: N, 11.18 (sadržaj peptida: 73%).

Primjer 38: 3-(4-Hidroksifenil)propionil-Gly-Gly-Pro-His-Ser-Cys-Asn-NH₂

Ovaj je spoj bio pripravljen u skladu s postupcima iz Primjera 1 i 2 uz slijedeće modifikacije: zaštićivanje kapićom na N-terminusu je bilo izvedeno korištenjem 3-(4-hidroksi-3,5-dijodfenil)propionske kiseline (3 ekv.), HBTU (3 ekv.), HOBT (3 ekv.) i NMM (6 ekv.). Naslovni spoj je bio izoliran kao fini bijeli prašak (24.2 mg, 30 %). NMR podaci su naznačili mješavinu dvije vrste u omjeru od približno 80: 20: ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 9.17, 8.51 (bs, d, 1H, $J=8.2$ Hz), 8.87-8.93 (m, 1 H), 8.10-8.31 (m, 3 H), 7.80-7.98 (m, 2 H), 7.35-7.38 (m, 2 H), 7.09 (d, 2H, $J=7.4$ Hz), 6.96-6.99 (m, 2 H), 6.92 (s, 1 H), 6.63-6.66 (m, 2 H), 5.14 (bs, 1 H), 4.59-4.77 (m, 1 H), 4.30-4.50 (m, 4 H), 3.85-4.00 (m, 2 H), 3.59-3.75 (m, 5 H), 2.89-3.05 (m, 1 H), 2.66-2.83 (m, 4 H), 2.36-2.46 (m, 4 H), 1.97-2.08 (m, 1 H), 1.67-1.90 (m, 2 H); MS m/z ($\text{C}_{34}\text{H}_{47}\text{N}_{11}\text{O}_{11}\text{S}+\text{H}$) $^+$ 818.6; Analitički izračunato za $\text{C}_{34}\text{H}_{47}\text{N}_{11}\text{O}_{11}\text{S}$: N, 18.84. Pronađeno: N, 14.36 (sadržaj peptida: 76%).

Primjer 39: Acetil-Pro-His-Ser-Cys-Asn-Gly-Gly-Lys(3-(4-hidroksifenil)propionil)-NH₂

Ovaj je spoj bio pripravljen u skladu s postupcima iz Primjera 2 i 3 sa slijedećim modifikacijama: stvaranje amida na lizinu je bilo provedeno s 3-(4-hidroksifenil)propionskom kiselinom (4 ekv.), HBTU (4 ekv.), HOBT (4 ekv.) i NMM (8 ekv.). Naslovni spoj je bio izoliran (16.2 mg, 13%) kao fini bijeli prašak. NMR podaci su naznačili mješavinu dvije vrste u omjeru od približno 75: 25: ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 8.97 (m, 1 H), 8.42-8.44, 8.19-8.30 (m, m, 3 H), 8.07-8.15 (m, 2 H), 7.94-8.04 (m, 1 H), 7.73-7.82 (m, 2 H), 7.45 (bs, 1 H), 7.35, 7.40 (bs, 1 H), 7.27 (m, 1 H), 6.95-7.01 (m, 4H), 6.63-6.65 (m, 2 H), 4.72-4.79 (m, 1 H), 4.61-4.68 (m, 1 H), 4.51-4.58 (m, 1 H), 4.41-4.48 (m, 1 H), 4.264.39 (m, 2 H), 4.10-4.17 (m, 1 H), 3.61-3.79 (m, 6 H), 3.48-3.55 (m, 2 H), 3.12-3.21 (m, 1 H), 2.96-3.02 (m, 3 H), 2.61-2.86 (m, 4 H), 2.25-2.39 (m, 3 H), 2.00 (s, 3 H), 1.63-1.91 (m, 3 H), 1.44-1.56 (m, 1 H), 1.18-1.37 (m, 4 H); MS m/z ($\text{C}_{42}\text{H}_{61}\text{N}_{13}\text{O}_{13}\text{S}+\text{H}$) $^+$ 988.8; Analitički izračunato za $\text{C}_{42}\text{H}_{61}\text{N}_{13}\text{O}_{13}\text{S}$: N, 18.43. Pronađeno: N, 12.75 (sadržaj peptida: 69%).

Primjer 40: 3-(4-Hidroksifenil)propionil-Gly-Gly-Gly-Gly-Pro-His-Ser-Cys-Asn-NH₂

Ovaj je spoj bio pripravljen u skladu s postupcima iz Primjera 2 i 3 uz slijedeću modifikaciju: zaštićivanje kapićom na N-terminusu je bilo izvedeno korištenjem 3-(4-hidroksi-3,5-dijodfenil)propionske kiseline (3 eq.), HBTU (3 eq.), HOBT (3 eq.) i NMM (6 eq.). Naslovni spoj je bio izoliran kao fini bijeli prašak (27.3 mg, 29%). NMR podaci su naznačili mješavinu dvije vrste u omjeru od približno 80: 20 : ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 8.87-8.92 (m, 1 H), 8.24,

8.53 (d, d, 1H, $J = 7.4, 8.4$ Hz), 8.31 (1H, $J = 8.4$ Hz), 8.08-8.19 (m, 4 H), 7.87-7.98 (m, 2 H), 7.39 (s, 1 H), 7.36 (s, 1 H), 7.10 (d, 1H, $J = 6.5$ Hz), 6.99 (app d, 2 H), 6.92 (s, 1 H), 6.65 (app d, 2 H), 4.59-4.77 (m, 1 H), 4.30-4.50 (m, 4 H), 3.86-4.02 (m, 2 H), 3.63-3.79 (m, 7 H), 2.92-3.04 (m, 3 H), 2.67-2.84 (m, 6 H), 2.36-2.46 (m, 5 H), 1.97-2.05 (m, 1 H), 1.82-1.90 (m, 2 H), 1.69-1.79 (m, 2 H); MS m/z ($C_{38}H_{53}N_{13}O_{13}S+H$)⁺ 932.6; Analitički izračunato za $C_{38}H_{53}N_{13}O_{13}S$: N, 19.54. Pronađeno: N, 12.89 (sadržaj peptida: 66%).

Primjer 41: (3-(4-Hidroksifenil)propionil)-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Pro-His-Ser-Cys-Asn-NH₂

Ovaj je spoj bio pripremljen u skladu s postupcima iz Primjera 1 i 2 uz slijedeću modifikaciju: zaštićivanje kapičom na N-terminusu je bilo izvedeno korištenjem 3-(4-hidroksi-3,5-dijodfenil)propionske kiseline (3 ekv.), HBTU (3 ekv.), HOBT (3 ekv.) i NMM (6 ekv.). Naslovni spoj je bio izoliran kao fini bijeli prašak (17.1 mg, 16%). NMR podaci su naznačili mješavinu dvije vrste u omjeru od približno 70: 30: ¹H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 9.11 (s, 1 H), 8.86, 8.92 (s, s, 1 H), 8.51, 8.05-8.16 (m, d, 6H, $J = 8.5$ Hz), 8.22-8.32 (m, 2 H), 7.87-7.98 (m, 2 H), 7.34-7.39 (m, 2 H), 7.11 (s, 1 H), 7.08 (s, 1 H), 6.98 (app d, 2 H), 6.92 (s, 1 H), 6.64 (app d, 2 H), 5.11 (bs, 1 H), 4.59-4.77 (m, 1 H), 4.31-4.50 (m, 4 H), 3.83-4.02 (m, 2 H), 3.71-3.79 (m, 9 H), 3.58-3.67 (m, 2 H), 3.48-3.53 (m, 2 H), 3.11-3.19 (m, 1 H), 2.91-3.04 (m, 2 H), 2.76-2.83 (m, 2H), 2.67-2.72 (m, 2 H), 2.35-2.46 (m, 4 H), 1.96-2.09 (m, 1 H), 1.71-1.90 (m, 4 H); MS m/z ($C_{42}H_{59}N_{15}O_{15}S+H$)⁺ 1046.8; Analitički izračunato za $C_{42}H_{59}N_{15}O_{15}S$: N, 20.08. Pronađeno: N, 15.84 (sadržaj peptida: 79%).

Primjer 42: (3-(4-Hidroksifenil)propionil)-Ahp-Pro-His-Ser-Cys-Asn-NH₂

Ovaj je spoj bio pripremljen u skladu s postupcima iz Primjera 1 i 2 uz slijedeću modifikaciju: zaštićivanje kapičom na N-terminusu je bilo izvedeno korištenjem 3-(4-hidroksifenil)propionske kiseline (3 ekv.), HBTU (3 ekv.), HOBT (3 ekv.) i NMM (6 ekv.). Naslovni spoj je bio izoliran kao fini bijeli prašak (47.4 mg, 57%). NMR podaci su naznačili mješavinu dvije vrste u omjeru od približno 70: 30: ¹H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 8.98 (m, 1 H), 8.21-8.44 (m, 2 H), 7.98-8.14 (m, 2 H), 7.71-7.77 (m, 1 H), 7.40 (s, 1 H), 7.35 (m, 1 H), 7.09 (d, 2H, $J = 9.8$ Hz), 6.95-6.98 (m, 2 H), 6.92 (s, 1 H), 6.62-6.54 (m, 2 H), 4.62-4.79 (m, 4 H), 4.28-4.50 (m, 8 H), 3.47-3.70 (m, 4 H), 3.12-3.19 (m, 1 H), 2.90-3.03 (m, 3 H), 2.76-2.83 (m, 2 H), 2.65-2.70 (m, 2 H), 2.40-2.46 (m, 2 H), 2.25-2.30 (m, 3 H), 1.72-2.08 (m, 4 H), 1.14-1.50 (m, 7 H); MS m/z ($C_{37}H_{54}N_{10}O_{10}S+H$)⁺ 831.8; Analitički izračunato za $C_{37}H_{54}N_{10}O_{10}S$: N, 16.86. Pronađeno: N, 13.10 (sadržaj peptida: 78%).

Primjer 43: Ac-Tyr-Ahp-Pro-His-Ser-Cys-Asn-NH₂

Ovaj je spoj bio pripremljen u skladu s postupcima iz Primjera 1 i 2 sa slijedećim modifikacijama: konačno vezanje amino kiseline je bilo provedeno s Ac-Tyr(3-jod)-OH (3 ekv.), HBTU (3 ekv.), HOBT (3 ekv.) i NMM (6 ekv.). Naslovni spoj je bio izoliran (40.9 mg, 46%) kao fini bijeli prašak. NMR podaci su naznačili mješavinu dvije vrste u omjeru od približno 80: 20: ¹H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 8.97 (m, 1 H), 8.21-8.44 (m, 2 H), 8.06-8.14 (m, 1 H), 7.97-7.99 (m, 2 H), 7.85-7.87 (m, 1 H), 7.40 (s, 1 H), 7.35 (s, 1 H), 7.09 (d, 2H, $J = 9.7$ Hz), 6.98-7.00 (m, 2 H), 6.92 (s, 1 H), 6.61-6.64 (m, 2 H), 4.59-4.66 (m, 2 H), 4.25-4.50 (m, 6 H), 3.59-3.71 (m, 2 H), 3.48-3.55 (m, 2 H), 3.12-3.19 (m, 1 H), 2.95-3.10 (m, 3 H), 2.76-2.83 (m, 3 H), 2.57-2.65 (m, 1 H), 2.38-2.46 (m, 2 H), 2.24-2.27 (m, 2 H), 1.80-2.10 (m, 1 H), 1.84-1.89 (m, 2 H), 1.76 (s, 3 H), 1.45-1.49 (m, 2 H), 1.15-1.35 (m, 6 H); MS m/z ($C_{39}H_{57}N_{11}O_{11}S+H$)⁺ 888.8; Analitički izračunato za $C_{39}H_{57}N_{11}O_{11}S$: N, 17.35. Pronađeno: N, 13.81 (sadržaj peptida: 80%).

Primjer 44: DOTA-In- β -Ala-Pro-His-Ser-Cys-Asn-NH₂

Ovaj je spoj bio pripremljen u skladu s postupcima iz Primjera 1 i 2 sa slijedećim modifikacijama: konačno vezanje amida je bilo provedeno s DOTA-tris(*t*-butil ester) (3 ekv.), HBTU (3 ekv.), HOBT (3 ekv.) i NMM (6 ekv.). Pročišćenom peptid-DOTA spoju (22.0 mg, 0.022 mmol) u 0.1 M AcOH (aq.) (0.5 mL) bio je dodan indijev klorid (48.6 mg, 0.22 mmol) otopljen u 1.0 mL vodene 0.2M otopine HCl i miješan kod sobne temperature kroz 2 sata. Kompleks je bio pročišćen u skladu s postupkom iz Primjera 2. Naslovni spoj je bio izoliran (40.9 mg, 46%) kao fini bijeli prašak. NMR podaci naznačili su mješavinu tri vrste u omjeru od približno 70: 20: 10: ¹H NMR (300 MHz, D₂O) δ 8.69-8.90 (m, 1 H), 7.39-7.55 (m, 1 H), 4.53-4.64 (m, 3 H), 4.39-4.48 (m, 1 H), 3.88-3.96 (m, 5H), 3.24-3.68 (m, 28 H), 3.00-3.02 (m, 3 H), 2.69-2.94 (m, 9 H), 2.24-2.43 (m, 2 H), 1.84-2.10 (m, 5 H); MS m/z ($C_{40}H_{61}InN_{14}O_{15}S+H$)⁺ 11245.8; Analitički izračunato za $C_{40}H_{61}InN_{14}O_{15}S$: N, 17.43. Pronađeno: N, 12.42 (sadržaj peptida: 71%).

Primjer 45: Acetil-Pro-His-Ser-Cys-Asn-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Lys-NH₂

Ovaj je spoj bio pripremljen u skladu s postupcima iz Primjera 1 i 2. Naslovni spoj je bio izoliran (15.4 mg, 10%) kao fini bijeli prašak. NMR podaci su naznačili mješavinu dvije vrste u omjeru od približno 75: 25: ¹H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 8.95-8.97 (m, 1 H), 8.43 i 8.02 (d, 1H, $J = 7.6$ Hz), 8.11-8.31 (m, 9 H), 7.84-7.86 (m, 1 H), 7.62 (bs, 3 H), 7.44 (bs 1 H), 7.34-7.39 (m, 1 H), 7.29 (s, 1 H), 7.05 (s, 1 H), 7.00 (s, 1 H), 4.51-4.79 (m, 3 H), 4.25-4.48 (m, 4 H),

4.12-4. 19 (m, 2 H), 3.74 (m, 10 H), 3.11-3. 21 (m, 2 H), 2.94-3. 03 (m, 2 H), 2.73-2. 82 (m, 5 H), 2.34-2. 39 (m, 1 H), 2.00 (s, 3 H), 1.67- 1.89 (m, 5 H), 1.46-1. 57 (m, 3 H), 1.24-1. 34 (m, 2 H); MS m/z ($C_{41}H_{65}N_{17}O_{15}S+H$)⁺ 1068.7; Analitički izračunato za $C_{41}H_{65}N_{17}O_{15}S$: N, 22.29. Pronađeno: N, 15.33 (sadržaj peptida: 69%).

5 Primjer 46: Acetil-Pro-His-Ser-Cys-Asn-Ava-Tyr-NH₂

Ovaj je spoj bio pripravljen u skladu s postupcima iz Primjera 1 i 2. Naslovni spoj je bio izoliran (56.5 mg, 44%) kao fini bijeli prašak. NMR podaci su naznačili mješavinu dvije vrste u omjeru od približno 75: 25 : ¹H NMR (300 MHz,DMSO-*d*₆)δ 9.13 (bs, 1 H), 8.96-8. 97 (m, 1 H), 8.20-8. 30 (m, 2 H), 8.13 (d, 1H,*J*= 7.8), 7.96-8. 04 (m, 1 H), 7.82 (d,1H, *J*= 8.5 Hz), 7.57-7. 61 (m, 1 H), 7.39 (s, 1 H), 7.34 (bs, 1 H), 6.93-7. 01 (m, 4 H), 6.61-6. 64 (m, 2 H), 4.62-4. 80 (m, 1 H), 4.25-4. 50 (m, 5 H), 3.15-3. 20 (m, 1 H), 2.95-3. 01 (m, 3 H), 2.75-2. 87 (m, 4 H), 2.58-2. 66 (m,1 H), 2.36-2. 49 (m, 2 H), 2.00-2. 02 (m, 5 H), 1.69-1. 88 (m, 3 H), 1.35-1. 37 (m, 2 H), 1.25-1. 28 (m, 2 H); MS m/z ($C_{37}H_{53}N_{11}O_{11}S+H$)⁺ 860.7; Analitički izračunato za $C_{37}H_{53}N_{11}O_{11}S$: N, 17.92. Pronađeno: N, 14.34 (sadržaj peptida: 80%).

15 Primjer 47: Acetil-Pro-His-Ser-Cys-Asn-Ahp-Tyr-NH₂

Ovaj je spoj bio pripravljen u skladu s postupcima iz Primjera 1 i 2. Naslovni spoj (49.5 mg, 37 %) je bio izoliran kao fini bijeli prašak. NMR podaci su naznačili mješavinu dvije vrste u omjeru od približno 80: 20 : ¹H NMR (300 MHz,DMSO-*d*₆)δ 9.12 (bs, 1 H), 8.97-8. 98 (m,1 H), 8.26-8. 29 (m,1 H), 8.42 i 8.21 (d,1H, *J*= 7.6 Hz), 8.13 i 7.95 (d,1H, *J*= 7.8 Hz), 7.81 (d,1H, *J*= 8.5 Hz), 7.57-7. 60 (m, 1 H), 7.39 (s, 1 H), 7.33 (bs, 2 H), 6.99-7. 01 (app d, 2 H), 6.96 (s,1 H), 6.93 (s, 1 H), 6.61-6. 64 (app d, 2 H), 4.60-4. 79 (m,1 H), 4.26-4. 53 (m, 5 H), 3.11-3. 21 (m,1 H), 2.94-3. 04 (m, 3 H), 2.73- 2.88 (m, 3 H), 2.58-2. 65 (m, 1 H), 2.39-2. 49 (m, 2 H), 2.00-2. 04 (m, 5 H), 1.70-1. 91 (m, 3 H), 1.28-1. 40 (m, 4 H), 1.05-1. 20 (m, 4 H); MS m/z ($C_{39}H_{57}N_{11}O_{11}S+H$)⁺ 888.8; Analitički izračunato za $C_{39}H_{57}N_{11}O_{11}S$: N, 17.35.Pronađeno: N, 13.84 (sadržaj peptida: 80%).

25

Primjer 48: 3-(4-Hidroksifenil)propionil-β-Ala-Pro-His-Ser-Cys-Asn-NH₂

Ovaj je spoj bio pripravljen u skladu s postupcima iz Primjera 1 i 2 sa slijedećim modifikacijama: zaštićivanje kapićom na N-terminusu je bilo izvedeno korištenjem 3-(4-hidroksifenil)propionske kiseline (3ekv.), HBTU (3 ekv.), HOBT (3 ekv.) i NMM (6 ekv.). Naslovni spoj je bio izoliran (61.1 mg, 53%) kao fini bijeli prašak. NMR podaci su naznačili mješavinu dvije vrste u omjeru od približno 75: 25: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆)δ 8.97 (bs, 1 H), 8.22-8. 29 (m, 2 H), 8.10-8. 13 (m, 1 H), 7.97 i 8.41 (d, 1H, *J*= 7.2 Hz), 7.80 (app t, 1 H), 7.34-7. 39 (m, 2 H), 7.08 (d, 2H, *J*= 9.8 Hz), 6.92-6. 98 (m, 3 H), 6.63- 6.66 (app d, 2 H), 4.60-4. 77 (m, 1 H), 4.27-4. 50 (m, 5 H), 3.65-3. 71 (m, 3 H), 3.39-3. 49 (m, 3 H), 3.11-3. 29 (m, 4 H), 2.94-3. 04 (m, 1 H), 2.76-2. 83 (m, 2 H), 2.37-2. 46 (m, 3 H), 2.26- 2.31 (m, 2 H), 1.97-2. 08 (m, 1 H), 1.72-1. 87 (m, 3 H);MS m/z ($C_{33}H_{46}N_{10}O_{10}S+H$)⁺ 775.7; Analitički izračunato za $C_{33}H_{46}N_{10}O_{10}S$: N, 18.08. Pronađeno: N, 12.76 (sadržaj peptida: 71%).

35

Primjer 49: 8-(4-Fluorbenzilamino)suberoil-β-Ala-Pro-His-Ser-Cys-Asn-NH₂

Ovaj je spoj bio pripravljen u skladu s postupcima iz Primjera 1 i 2 uz slijedeću modifikaciju: zaštićivanje kapićom na N-terminusu je bilo izvedeno korištenjem 8-(4-fluorbenzilamino)suberinske kiseline (3 ekv.), HBTU (3 ekv.), HOBT (3 ekv.) i NMM (6 ekv.). Naslovni spoj je bio izoliran kao fini bijeli prašak (70.8 mg, 53 %). NMR podaci su naznačili mješavinu dvije vrste u omjeru od približno 70: 30: ¹H NMR (300 MHz,DMSO-*d*₆)δ 8.97 (s, 1 H), 8.22-8. 28 (m, 3 H), 8.11-8. 14 (m, 1 H), 7.96-7. 99 i 8.40-8. 43 (m, 1 H), 7.74-7. 80 (m, 1 H), 7.34-7. 39 (m, 2H), 7.24-7. 29 (m, 2 H), 7.08- 7. 16 (m, 4 H), 6.92 (bs, 1 H), 4.29-4. 50 (m, 7 H), 4.22 (d, 2H,*J*= 5.9 Hz), 3.63-3. 69 (m, 2 H), 3.44-3. 52 (m, 2 H), 3.16-3. 26 (m, 3 H), 2.97-3. 02 (m,1 H), 2.76-2. 83 (m, 2 H), 2.38-2. 49 (m, 3 H), 1.99-2. 13 (m, 5 H), 1.72-1. 89 (m, 3 H), 1.42-1. 54 (m, 4 H), 1.20-1. 24 (m, 4 H); MS m/z ($C_{34}H_{47}N_{11}O_{11}S+H$)⁺ 818.6; Analitički izračunato za $C_{34}H_{47}N_{11}O_{11}S$: N, 17.31. Pronađeno: N, 11.72 (sadržaj peptida: 68%).

45

50 Primjer 50: m-dPEG-β-Ala-His-Ser-Cys-Asn-NH₂

Ovaj je spoj bio pripravljen u skladu s postupcima iz Primjera 1 i 2 uz slijedeću modifikaciju: zaštićivanje kapićom na N-terminusu je bilo izvedeno korištenjem NHS-m-dPEGTM (Quanta Biodesign, 1.9 ekv.), i TEA (9 ekv.). Naslovni spoj je bio izoliran kao fini bijeli prašak (38 mg, 21%) : ¹H NMR (300 MHz,D₂O)δ 8.58 (d, 1H, *J*= 1.2 Hz), 7.28 (d,1H,*J*= 0.8 Hz), 4.75-4. 61 (m, 2 H), 4.53 (t,1H,*J*= 6. 2 Hz), 4.44 (t, 1H,*J*= 5.6 Hz), 4.34-4. 29 (dd, 1H,*J*= 5.1 Hz, 3.6 Hz), 3.82 (t, 2H,*J*= 5.4 Hz), 3.71 (t, 2H,*J*= 6.1 Hz), 3.64-3. 61 (m, 4H), 3.58-3. 54 (m, 4H), 3.40 (t, 2H, *J*= 6.7 Hz), 3.63-3. 69 (m, 2 H), 3.44-3. 52 (m, 2 H), 3.16-3. 26 (m, 3 H), 2.97-3. 02 (m,1 H), 3.32 (s, 3 H), 3.25 (d,1H,*J*= 5.9 Hz), 3.18 (d, 1H, *J*= 8.4 Hz), 2.90 (d, 2H, *J*= 6.2 Hz), 2.83-2. 56 (m, 3 H), 2.46 (t, 2H, *J*= 6.1 Hz), 2.25-2. 15 (m, 1H), 1.92-1. 87 (m,1H), 1.83-1. 76 (m, 1H); MS m/z ($C_{50}H_{88}N_{10}O_{21}S+H$)⁺ 1198.1.

60

Primjer 51: Vezanje DTPA za PHSCN

Otopina za smolu ("Rink Amide AM" smola) vezanog PHSCN-a (143 mg, 0.36 mmol/g, 0.051 mmol), p-SCN-benzil DTPA (66 mg, 0.103 mmol), NNM (120 μ L, 2.1 mmol), u bezvodnom DMF-u (2mL) je bila nježno tresena s dušikom kroz 7 sati pri sobnoj temperaturi, a reakcijska mješavina je bila filtrirana i isprana jednom s DMF-om. Taj je korak bio ponavlján još dva puta. Smola je bila isprana tri puta s DMF-om, tri puta s metanolom i tri puta s diklormetanom. Rezultirajući za smolu vezani spoj je bio tretiran s TFA/TIS/voda (95: 2.5 : 2.5, 1 mL po 100 mg smole) i tresen s dušikom kroz 1 sat. Reakcijska mješavina je bila filtrirana, smola je bila isprana jednom s TFA/TIS/voda i tri puta s diklormetanom. Otapalo je bilo uklonjeno u vakuumu, a rezultirajući talog je bio trituiran tri puta s eterom. Rezultirajući bijeli prašak je bio podvrgnut prep. HPLC pročišćavanju u skladu s postupkom iz Primjera 2 kako bi se dobilo 15.5 mg (0.014mmol, 27.7%) željenog produkta: ^1H NMR (300 MHz, D_2O) δ 8.66 (s, 1H), 7.40-7.31 (m, 5H), 4.97-4.92 (dd, J = 4.92, 5.31 Hz, 1H), 4.87-4.83 (m, 2H), 4.77-4.72 (m, 1H), 4.65-4.56 (m, 2H), 4.00-3.97 (m, 4H), 3.91-3.72 (m, 10H), 3.49-3.20 (m, 6H), 3.03-2.97 (m, 2H), 2.92-2.73 (m, 4H), 2.38 (m, 1H), 2.20 (m, 2H), 2.04-1.85 (m, 2H); MS m/z ($\text{C}_{43}\text{H}_{61}\text{N}_{13}\text{O}_{17}\text{S}_2+\text{H}$) $^+$ 1096.8.

Primjer 52: Kelatiranje In^{3+} na DTPA-PHSCN

DTPA-PHSCN (20mg, 0.018mmol) je bio otopljen u 1 mL 0.1M vodende otopine AcOH te je InCl_3 (40mg, 0.18mmol) bio otopljen u 2 mL 0.02M HCl otopine. Dvije su otopine bile kombinirane i inkubirane kroz jedan sat pri sobnoj temperaturi. Otápalo je bilo ispareno pod smanjenim tlakom, a rezultirajući bijeli prašak je bio podvrgnut prep. HPLC pročišćavanju u skladu s postupkom iz Primjera 2 kako bi se dobilo 7.1 mg (0.00588mmol, 32.6%) željenog produkta: ^1H NMR (300 MHz, D_2O) δ 8.66 (s, 1H), 7.41- 7.31 (m, 5H), 4.97-4.92 (dd, J = 4.86, 5.46 Hz, 1H), 4.86-4.84 (m, 2H), 4.76-4.72 (dd, J = 5.43, 2.88 Hz, 1H), 4.61-4.57 (m, 2H), 4.04 (d, J = 17.22 Hz, 1H), 3.90 (d, J = 5.82 Hz, 2H), 3.81-3.60 (m, 5H), 3.50-3.19 (m, 10H), 3.14-2.73 (m, 8H), 2.39 (m, 1H), 2.16 (m, 1H), 2.04-1.91 (m, 2H); MS m/z ($\text{C}_{43}\text{H}_{58}\text{InN}_{13}\text{O}_{17}\text{S}_2+\text{H}$) $^+$ 1208.8; Analitički izračunato za $\text{C}_{43}\text{H}_{58}\text{InN}_{13}\text{O}_{17}\text{S}_2$: N, 15.07. Pronađeno: N, 11.58 (sadržaj peptida: 76.8%).

Primjer 53: Acetil-Pro-His-Ser-Cys-Asn-Gly-Gly-Gly-Lys-NH₂

Ovaj je spoj bio pripravljen u skladu s postupcima iz Primjera 1 i 2. Naslovni spoj je bio izoliran (101 mg, 70%) kao fini bijeli prašak: ^1H NMR(300 MHz, D_2O) δ 8.57 (d, J = 1.32 Hz, 1H), 7.26 (s, 1H), 4.73-4.72 (m, 2H), 4.52 (t, J = 6.24, 1H), 4.43 (t, J = 5.25 Hz, 1H), 4.27 (m, 2H), 3.94-3.91 (m, 8H), 3.81 (t, J = 5.40 Hz, 2H), 3.57 (t, J = 6.78 Hz, 1H), 3.31-3.24 (dd, J = 15.57, 5.67 Hz, 1H), 3.18-3.09 (dd, J = 15.6, 8.64 Hz, 2H), 2.96-2.83 (m, 4H), 2.80-2.73 (m, 2H), 2.20-2.16 (m, 1H), 2.05 (s, 3H), 1.94-1.57 (m, 6H), 1.42-1.34 (m, 2H); MS m/z ($\text{C}_{37}\text{H}_{59}\text{N}_{15}\text{O}_{13}\text{S}+\text{H}$) $^+$ 954.9.

Primjer 54: Acetil-Pro-His-Ser-Cys-Asn-Gly-Gly-Lys(protoporfirin)-NH₂

Ovaj je spoj bio pripravljen u skladu s postupcima iz Primjera 2 i 3 sa slijedećim modifikacijama: tretman 2%-tnim hidrazinom za uklanjanje zaštitne grupe s ivDde na lizinu je bio ponavlján 10 puta, a stvaranje amida na lizinu je bilo provedeno s protoporfirinom IX (2 ekv.), PyBOP (2 ekv.), i NMM (6 ekv.). Naslovni spoj je bio izoliran (7.6 mg, 5.49 μ M, 8.6%) kao fini tamno crveni prašak.; MS m/z ($\text{C}_{67}\text{H}_{85}\text{N}_{17}\text{O}_{14}\text{S}+\text{H}$) $^+$ 1385.6.

Primjer 55: Ac-Tyr- β -Ala-Pro-His-Ser-Cys-Asn-NH₂

Ovaj je spoj bio pripravljen iz "Rink amide AM" smole u skladu s postupcima iz Primjera 1 i 2 te je bio izoliran kao bijela, pahuljasta krutina; ES MS m/z ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ 832, ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$ 854.

Primjer 56: Ac-Pro-His-Ser-Cys-Asn- β -Ala-Tyr-NH₂

Ovaj je spoj bio pripravljen iz "Rink amide AM" smole u skladu s postupcima iz Primjera 1 i 2 te je bio izoliran kao bijela, pahuljasta krutina; ES MS m/z ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ 832, ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$ 854.

Primjer 57: Ac-Pro-His-Ser-Cys-Asn-Gly-Gly-Lys-NH₂

Ovaj je spoj bio pripravljen iz "Rink amide AM" smole u skladu s postupcima iz Primjera 1 i 2 te je bio izoliran kao bijela, pahuljasta krutina; ES MS m/z ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ 840

Primjer 58: Ac-Pro-His-Ser-Cys-Asn-Gly-Gly-Lys(biotin)-NH₂

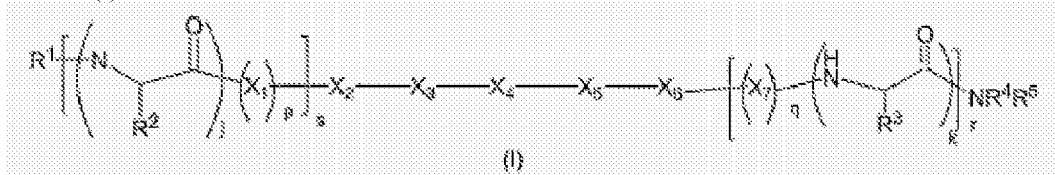
Ovaj je spoj bio pripravljen iz "Rink amide AM" smole u skladu s postupcima iz Primjera 1 i 2 te je bio izoliran kao bijela, pahuljasta krutina; ES MS m/z ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ 1066.5.

Konačno, treba zapaziti da postoje alternativni načini primjene ovog izuma. U skladu s time, predstavljeni aspekti se trebaju smatrati kao objašnjenja a ne kao ograničenja, a izum ne treba biti ograničen na detalje koji su ovdje iznijeti,

nego oni mogu biti modificirani unutar područja i ekvivalenata priključenih zahtjeva. Svi objavljeni dokumenti i patenti koji su ovdje citirani su uključeni pomoću reference u cijelom njihovom opsegu.

5 PATENTNI ZAHTEJEVI

1. Spoj formule(I):



ili njegovu farmaceutski prihvatljivu sol, solvat, hidrat ili N-oksid, **a koji je spoj naznačen time da:**

j i k nezavisno predstavljaju 0 ili 1;

p i q nezavisno predstavljaju cijeli broj između i uključujući 0 i 100;

r i s nezavisno predstavljaju 0 ili 1;

R¹ predstavlja acil, supstituirani acil, acil kelat, alkil, supstituirani alkil, cikloalkil, supstituirani cikloalkil, imino ili supstituirani imino;

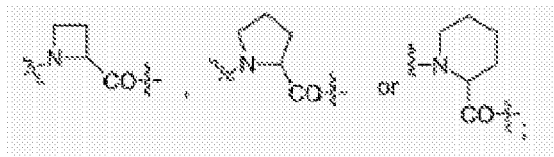
R² predstavlja C₁-C₆ alkil pri čemu je najmanje jedan atom vodika zamijenjen supstituentom odabranim iz grupe koja se sastoji od: -NR⁶R⁷, -OR⁸, -CO₂R⁹, -S(O)₂R¹⁰, -P(OR¹¹)OR¹², aril i supstituirani aril;

R⁶, R⁷, R⁸, R⁹, R¹⁰, R¹¹ i R¹² su nezavisno odabrani iz grupe koja se sastoji od: vodik, acil, supstituirani acil, acil kelat, alkil, supstituirani alkil, cikloalkil, supstituirani cikloalkil, imino i supstituirani imino;

X₁ predstavlja -NH(C=C)_gCO-, -NH(CH₂)_hCO- ili -NHCH(CH₃)CO-;

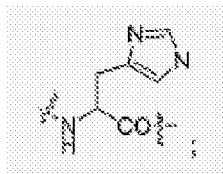
g i h nezavisno predstavljaju 1, 2, 3, 4, 5 ili 6

X₂ predstavlja

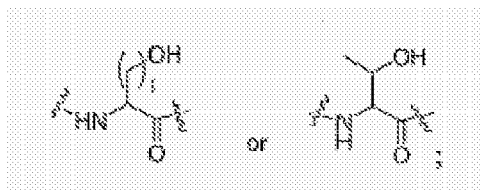


Ključ uz sliku: or = ili

X₃ predstavlja



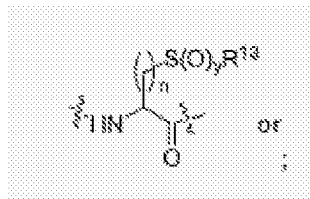
X₄ predstavlja



Ključ uz sliku: or = ili

l predstavlja cijeli broj od 1 do 4;

X_5 predstavlja



Ključ uz sliku: or = ili

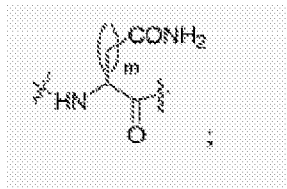
5 R^{13} predstavlja vodik, alkil, supstituirani alkil, acil, supstituirani acil, arilalkil, supstituirani arilalkil, aril, supstituirani aril ili $-S(O)_xR^{14}$;

n predstavlja cijeli broj od 1 do 5;

10 R^{14} predstavlja alkil, supstituirani alkil, acil, supstituirani acil, arilalkil, supstituirani arilalkil, aril ili supstituirani aril;

y i x nezavisno predstavljaju 0, 1 ili 2;

X_6 predstavlja



15 m predstavlja cijeli broj 1, 2, 3 ili 4;

20 X_7 predstavlja $-NH(C=O)_dCO-$, $-NH(CH_2)_eCO-$ ili $-NHCH(CH_3)CO-$;

d i e nezavisno predstavljaju 1, 2, 3, 4, 5 ili 6;

25 R^3 predstavlja C_1-C_6 alkil pri čemu je najmanje jedan atom vodika zamijenjen supstituentom odabranim iz grupe koja se sastoji od: $-NR^{15}R^{16}$, $-OR^{17}$, $-CO_2R^{18}$, $-S(O)_nR^{19}$, $-P(OR^{20})OR^{21}$, aril i supstituirani aril;

30 R^4 i R^5 nezavisno predstavljaju vodik, alkil ili supstituirani alkil; a

R^{15} , R^{16} , R^{17} , R^{18} , R^{19} , R^{20} i R^{21} su nezavisno odabrani iz grupe koja se sastoji od: vodik, acil, supstituirani acil, acil kelat, alkil, supstituirani alkil, cikloalkil, supstituirani cikloalkil, imino i supstituirani imino;

35 uz uvjet da R^1 ne predstavlja acetil u slučaju kada R^4 i R^5 predstavljaju vodik, a r i s predstavljaju 0.

2. Spoj iz zahtjeva 1, **koji je naznačen time da** R^1 ne predstavlja acetil u slučaju kada R^4 i R^5 predstavljaju vodik.

3. Spoj iz zahtjeva 1, **koji je naznačen time da** najmanje jedan od r ili s predstavljaju 1.

4. Spoj iz zahtjeva 1, **koji je naznačen time da** s predstavlja 1, a r predstavlja 0.

35 5. Spoj iz zahtjeva 1, **koji je naznačen time da** s predstavlja 0, a r predstavlja 1.

6. Spoj iz zahtjeva 1, **koji je naznačen time da** R^1 predstavlja acil, supstituirani acil, acil kelat, imino ili supstituirani imino.

7. Spoj iz zahtjeva 1, **koji je naznačen time da** R^2 predstavlja C_1-C_6 alkil pri čemu je najmanje jedan atom vodika zamijenjen supstituentom odabranim iz grupe koja se sastoji od $-NR^6R^7$, $-OR^8$ i $-CO_2R^9$.

40 8. Spoj iz zahtjeva 7, **koji je naznačen time da** su R^6 , R^7 , R^8 i R^9 nezavisno odabrani iz grupe koja se sastoji od: vodik, acil, supstituirani acil, acil kelat, imino ili supstituirani imino.

9. Spoj iz zahtjeva 1, **koji je naznačen time da** X_1 predstavlja $-NH(CH_2)_hCO-$.

10. Spoj iz zahtjeva 1, **koji je naznačen time da** R^3 predstavlja C_1-C_6 alkil pri čemu je najmanje jedan atom vodika zamijenjen supstituentom odabranim iz grupe koja se sastoji od: $-NR^{15}R^{16}$, $-OR^{17}$ i $-CO_2R^{18}$.

45 11. Spoj iz zahtjeva 1, **koji je naznačen time da** su R^{15} , R^{16} , R^{17} i R^{18} nezavisno odabrani iz grupe koja se sastoji od: vodik, acil, supstituirani acil, acil kelat, imino ili supstituirani imino.

12. Spoj iz zahtjeva 1, **koji je naznačen time da:**

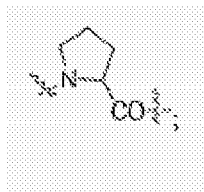
R^1 predstavlja acil ili supstituirani acil;

50 R^2 predstavlja C_1-C_4 alkil pri čemu je najmanje jedan atom vodika zamijenjen supstituentom odabranim iz grupe koja se sastoji od: $-NR^6R^7$, aril i supstituirani aril;

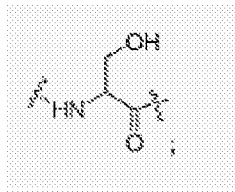
R^6 i R^7 su nezavisno odabrani iz grupe koja se sastoji od: vodik, acil, supstituirani acil;

X_1 predstavlja $-\text{NH}(\text{CH}_2)_h\text{CO}-$;

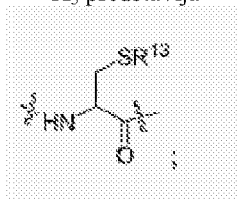
X_2 predstavlja



X_4 predstavlja

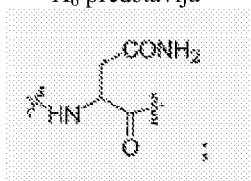


X_5 predstavlja



R^{13} predstavlja vodik, acil, supstituirani acil, alkil ili supstituirani alkil;

X_6 predstavlja



X_7 predstavlja $-\text{NH}(\text{CH}_2)_e\text{CO}-$;

R^3 predstavlja $\text{C}_1\text{-C}_4$ alkil kojemu je najmanje jedan atom vodika zamijenjen supstituentom odabranim iz grupe koja se sastoji od: $-\text{NR}^{15}\text{R}^{16}$, aril i supstituirani aril;

R^{15} i R^{16} su nezavisno odabrani iz grupe koja se sastoji od: vodik, acil, supstituirani acil; a

R^4 i R^5 predstavljaju vodik.

13. Spoj iz zahtjeva 12, **koji je naznačen time da:**

s predstavlja 0, a r predstavlja 1;

k predstavlja 1;

R^1 predstavlja acetil;

R^{13} predstavlja vodik;

e predstavlja 1; a

R^3 predstavlja $-(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$.

14. Spoj iz zahtjeva 13, **koji je naznačen time da** q predstavlja 2, 4 ili 6.

15. Spoj iz zahtjeva 12, **koji je naznačen time da**

s predstavlja 0, a r predstavlja 1;

k predstavlja 1;

R^1 predstavlja acetil;

R^{13} predstavlja vodik;

e predstavlja 2, 4 ili 6; a

R^3 predstavlja $-(CH_2)_4NHCO(CH_2)_2-Ph-(4-OH)$.

16. Spoj iz zahtjeva 15, **koji je naznačen time da** q predstavlja 1.

17. Spoj iz zahtjeva 12, **koji je naznačen time da:**

s predstavlja 0, a r predstavlja 1;

k predstavlja 1;

R^1 predstavlja acetil;

R^{13} predstavlja vodik;

e predstavlja 2, 4 ili 6, a

R^3 predstavlja $-CH_2-Ph-(4-OH)$.

18. Spoj iz zahtjeva 17, **koji je naznačen time da** q predstavlja 1;

19. Spoj iz zahtjeva 12, **koji je naznačen time da**

s predstavlja 0, a r predstavlja 1;

k predstavlja 1;

R^1 predstavlja acetil;

R^{13} predstavlja metil;

e predstavlja 1; a

R^3 predstavlja $-(CH_2)_4NH_2$.

20. Spoj iz zahtjeva 19, **koji je naznačen time da** q predstavlja 2.

21. Spoj iz zahtjeva 12, **koji je naznačen time da:**

s predstavlja 1, a r predstavlja 0;

j predstavlja 1;

R^1 predstavlja acetil;

R^{13} predstavlja vodik;

h predstavlja 1; a

R^2 predstavlja $-CH_2-Ph-(4-OH)$.

22. Spoj iz zahtjeva 21, **koji je naznačen time da** p predstavlja 2, 4 ili 6.

23. Spoj iz zahtjeva 12, **koji je naznačen time da**

s predstavlja 1, a r predstavlja 0;

j predstavlja 1;

R^1 predstavlja acetil;

R^{13} predstavlja vodik;

h predstavlja 2, 4, ili 6; a

R^2 predstavlja $-\text{CH}_2\text{-Ph-(4-OH)}$.

5 24. Spoj iz zahtjeva 23, **koji je naznačen time da** p predstavlja 1.

25. Spoj iz zahtjeva 12, **koji je naznačen time da:**

s predstavlja 1, a r predstavlja 0;

10 j predstavlja 0;

R^1 predstavlja $-\text{CO}(\text{CH}_2)_2\text{-Ph-(4-OH)}$;

R^{13} predstavlja vodik; a

15

h predstavlja 1.

26. Spoj iz zahtjeva 25, **koji je naznačen time da** p predstavlja 2, 4 ili 6.

27. Spoj iz zahtjeva 12, **koji je naznačen time da:**

20 s predstavlja 1, a r predstavlja 0;

j predstavlja 0;

R^1 predstavlja $-\text{CO}(\text{CH}_2)_2\text{-Ph-(4-OH)}$;

25

R^{13} predstavlja vodik; a

h predstavlja 2, 4 ili 6.

28. Spoj iz zahtjeva 27, **koji je naznačen time da** p predstavlja 1.

30 29. Spoj iz zahtjeva 12, **koji je naznačen time da:**

s predstavlja 0, a r predstavlja 0;

R^1 predstavlja $-(\text{CH}_2)_2\text{-Ph-(4-OH)}$; a

35

R^{13} predstavlja vodik.

30. Spoj iz zahtjeva 12, **koji je naznačen time da:**

31.

s predstavlja 0, a r predstavlja 0;

40

R^1 predstavlja $-\text{COPh-(4-F)}$; a

R^{13} predstavlja vodik.

32. Spoj iz zahtjeva 12, **koji je naznačen time da:**

s predstavlja 0, a r predstavlja 1;

k predstavlja 1;

R¹ predstavlja acetil;

R¹³ predstavlja metil ili vodik;

e predstavlja 1; a

R³ predstavlja $-(CH_2)_4NHCOPh-(4-F)$.

33. Spoj iz zahtjeva 31, **koji je naznačen time da** q predstavlja 2.

34. Spoj iz zahtjeva 12, **koji je naznačen time da:**

s predstavlja 0, a r predstavlja 1;

k predstavlja 1;

R¹ predstavlja acetil;

R¹³ predstavlja vodik;

e predstavlja 1; a

R³ predstavlja $-(CH_2)_4NH-8-[4'-fluorbenzilamino]suberoil$ ili $-(CH_2)_4NHCOCH_2F$

35. Spoj iz zahtjeva 33, **koji je naznačen time da** q predstavlja 2.

36. Spoj iz zahtjeva 12, **koji je naznačen time da:**

s predstavlja 1, a r predstavlja 0;

j predstavlja 0;

R¹ predstavlja $8-[4'-fluorbenzilamino]suberoil$ ili $-COCH_2F$;

R¹³ predstavlja vodik; a

h predstavlja 2.

37. Spoj iz zahtjeva 35, **koji je naznačen time da** p predstavlja 1.

38. Spoj iz zahtjeva 12, **koji je naznačen time da**

s predstavlja 0, a r predstavlja 1;

k predstavlja 1;

R¹ predstavlja acetil;

R¹³ predstavlja vodik; a

R³ predstavlja $-CH_2Ph-(3-I, 4-OH)$ ili $-CH_2Ph-(3,5-diI, 4-OH)$.

39. Spoj iz zahtjeva 37, **koji je naznačen time da** q predstavlja 0.

40. Spoj iz zahtjeva 37, **koji je naznačen time da** q predstavlja 1, a e predstavlja 2.

41. Spoj iz zahtjeva 37, **koji je naznačen time da** q predstavlja 1, a e predstavlja 1.

42. Spoj iz zahtjeva 12, **koji je naznačen time da**

s predstavlja 1, a r predstavlja 0;

j predstavlja 1;

R^1 predstavlja acetil;

R^{13} predstavlja vodik; a

R^2 predstavlja $-\text{CH}_2\text{Ph}-(3\text{-I}, 4\text{-OH})$ ili $-\text{CH}_2\text{Ph}-(3,5\text{-diI}, 4\text{-OH})$.

43. Spoj iz zahtjeva 41, **koji je naznačen time da** p predstavlja 0.

44. Spoj iz zahtjeva 12, **koji je naznačen time da**

s predstavlja 0, a r predstavlja 0;

R^1 predstavlja $-\text{CO}(\text{CH}_2)_2\text{Ph}(4\text{-OH}, 3,5\text{ di-I})$; a

R^{13} predstavlja vodik.

45. Spoj iz zahtjeva 12, **koji je naznačen time da**

s predstavlja 1, a r predstavlja 0;

j predstavlja 0;

R^1 predstavlja $-\text{CO}(\text{CH}_2)_2\text{Ph}(4\text{-OH}, 3,5\text{ di-I})$;

h predstavlja 2; a

R^{13} predstavlja vodik.

46. Spoj iz zahtjeva 44, **koji je naznačen time da** p predstavlja 1.

47. Spoj iz zahtjeva 12, **koji je naznačen time da**

s predstavlja 1, a r predstavlja 0;

j predstavlja 1;

R^1 predstavlja acetil;

R^2 predstavlja $-\text{CH}_2\text{-Ph}(4\text{-OH}, 3,5\text{ di-I})$;

h predstavlja 2; a

R^{13} predstavlja vodik.

48. Spoj iz zahtjeva 46, **koji je naznačen time da** p predstavlja 1.

49. Spoj iz zahtjeva 12, **koji je naznačen time da**

s predstavlja 0, a r predstavlja 1;

R^3 predstavlja $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCO}(\text{CH}_2)_2\text{-Ph}(4\text{-OH}, 3,5\text{ di-I})$;

e predstavlja 1; a

R^{13} predstavlja vodik.

50. Spoj iz zahtjeva 48, **koji je naznačen time da** q predstavlja 2.

51. Spoj iz zahtjeva 1, **koji je naznačen time da:**

R^1 predstavlja acil kelat;

R^2 , R^6 , R^7 , X_1 , X_2 , X_4 , X_5 , R^{13} , X_6 , X_7 , R^3 , R^{15} , R^{16} , R^4 i R^5 imaju značenja kako su definirana u zahtjevu 12.

52. Spoj iz zahtjeva 50, **koji je naznačen time da**

s predstavlja 1, a r predstavlja 0;

j predstavlja 0;

R^1 predstavlja DOTA-In;

h predstavlja 2; a

R^{13} predstavlja vodik.

53. Spoj iz zahtjeva 51, **koji je naznačen time da** p predstavlja 1.

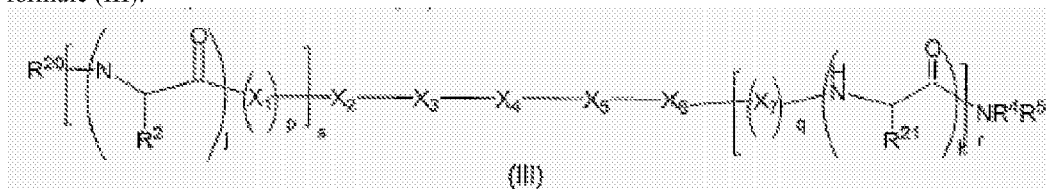
54. Spoj iz zahtjeva 50, **koji je naznačen time da**

s predstavlja 0, a r predstavlja 0;

R^1 predstavlja DPTA ili DPTA-In; a

R^{13} predstavlja vodik.

55. Spoj formule (III):



ili njegovu farmaceutski prihvatljivu sol, solvat, hidrat ili N-oksidi, **a koji je spoj naznačen time da:**

R^{20} predstavlja acil, supstituirani acil, alkil, supstituirani alkil, cikloalkil, supstituirani cikloalkil, imino, supstituirani imino ili dijagnostičko sredstvo;

R^{21} predstavlja C_1 - C_6 alkil pri čemu je najmanje jedan atom vodika zamijenjen supstituentom odabranim iz grupe koja se sastoji od $-NHR^{22}$;

R^{22} predstavlja vodik, acil, supstituirani acil, alkil, supstituirani alkil ili dijagnostičko sredstvo; a

j, k, p, q, r, s, $R^2, X_1, X_2, X_3, X_4, X_5, X_6, X_7, R^4$ i R^5 imaju značenja kako su definirana u zahtjevu 1;

uz uvjet da najmanje jedan od R^{20} i R^{22} predstavlja dijagnostičko sredstvo.

56. Spoj iz zahtjeva 54, **koji je naznačen time da** $R^2, X_1, X_2, X_3, X_4, X_5, X_6, X_7, R^4$ i R^5 imaju značenja kako su definirana u zahtjevu 12.

57. Spoj iz zahtjeva 55, **koji je naznačen time da** R^{20} predstavlja fluorescencijsko sredstvo.

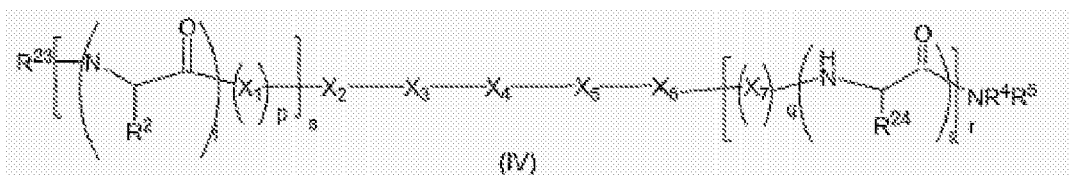
58. Spoj iz zahtjeva 56, **koji je naznačen time da** R^{20} predstavlja 5/6 karboksi fluorescein, s predstavlja 1, r predstavlja 0, j predstavlja 0, e predstavlja 2, a p predstavlja 1.

59. Spoj iz zahtjeva 55, **koji je naznačen time da** R^{22} predstavlja fluorescencijsko sredstvo.

60. Spoj iz zahtjeva 58, **koji je naznačen time da** R^{21} predstavlja $(CH_2)_4NH$ -, R^{22} predstavlja 5/6 karboksi fluorescein, s predstavlja 0, r predstavlja 1, k predstavlja 1, e predstavlja 1, a q predstavlja 2.

61. Spoj iz zahtjeva 55, **koji je naznačen time da** R^{21} predstavlja $(CH_2)_4NH$ -, R^{22} predstavlja biotin, s predstavlja 0, r predstavlja 1, k predstavlja 1, e predstavlja 1, a q predstavlja 2.

62. Spoj formule (IV):



ili njegovu farmaceutski prihvatljivu sol, solvat, hidrat ili N-oksidi, **a koji je spoj naznačen time da:**

R^{23} predstavlja acil, supstituirani acil, alkil, supstituirani alkil, cikloalkil, supstituirani cikloalkil, imino, supstituirani imino ili pegilirajuće sredstvo;

R^{24} predstavlja C_1 - C_6 alkil pri čemu je najmanje jedan atom vodika zamijenjen supstytutentom odabranim iz grupe koja se sastoji od-NHR²⁸ pri čemu R^{28} predstavlja vodik, acil, supstituirani acil, alkil supstituirani alkil ili pegilirajuće sredstvo; a

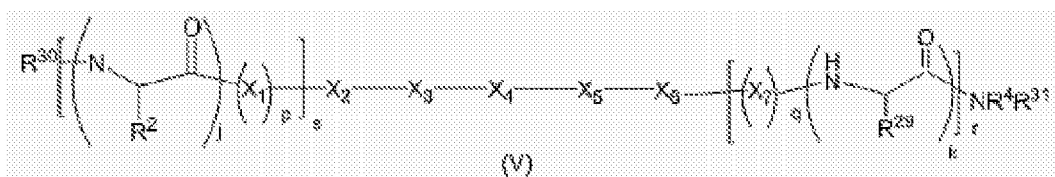
j, k, p, q, r, s, R^2 , X_1 , X_2 , X_3 , X_4 , X_5 , X_6 , X_7 , R^4 i R^5 imaju značenja kako su definirana u zahtjevu 1;

uz uvjet da najmanje jedan od R^{23} ili R^{28} predstavlja pegilirajuće sredstvo.

63. Spoj iz zahtjeva 61, **koji je naznačen time da** R^2 , X_1 , X_2 , X_3 , X_4 , X_5 , X_6 , X_7 , R^4 i R^5 imaju značenja kako su definirana u zahtjevu 12.

64. Spoj iz zahtjeva 62, **koji je naznačen time da** R^{23} predstavlja m-dPEG, s predstavlja 1, r predstavlja 0, j predstavlja 0, h predstavlja 2, a p predstavlja 1.

65. Spoj formule (V):



ili njegovu farmaceutski prihvatljivu sol, solvat, hidrat ili N-oksid, **a koji je spoj naznačen time da:**

R^{29} predstavlja C_1 - C_6 alkil s najmanje jednim atomom vodika zamijenjenim s -NHR³²;

R^{30} predstavlja acil, supstituirani acil, alkil, supstituirani alkil ili terapeutsko sredstvo.

R^{31} predstavlja vodik, alkil, supstituirani alkil ili terapeutsko sredstvo;

R^{32} predstavlja vodik, acil supstituirani acil, alkil, supstituirani alkil ili terapeutsko sredstvo; a;

j, k, p, q, r, s, R^2 , X_1 , X_2 , X_3 , X_4 , X_5 , X_6 , X_7 i R^4 i R^5 imaju značenja kako su definirana u zahtjevu 1;

uz uvjet da najmanje jedan od R^{30} , R^{31} i R^{32} predstavlja terapeutsko sredstvo.

66. Spoj iz zahtjeva 64, **koji je naznačen time da** R^2 , X_1 , X_2 , X_3 , X_4 , X_5 , X_6 , X_7 i R^4 imaju značenja kako su definirana u zahtjevu 12.

67. Spoj iz zahtjeva 65, **koji je naznačen time da** R^{13} predstavlja metil ili acetil, s predstavlja 0, r predstavlja 0, R^{30} predstavlja acetil, a R^{31} predstavlja terapeutsko sredstvo.

68. Spoj iz zahtjeva 66, **koji je naznačen time da** terapeutsko sredstvo predstavlja doksorubicin.

69. Spoj iz zahtjeva 65, **koji je naznačen time da** R^{13} predstavlja metil ili vodik, s predstavlja 0, r predstavlja 1, k predstavlja 1, e predstavlja 1, q predstavlja 2, R^{30} predstavlja acetil, R^{31} predstavlja vodik, R^{29} predstavlja - $(CH_2)_4$ NHR³².

70. Spoj iz zahtjeva 68, **koji je naznačen time da** R^{32} predstavlja -CO(CH₂)₃-doksorubicin.

71. Spoj iz zahtjeva 68, **koji je naznačen time da** R^{32} predstavlja protoporfirin.

72. Farmaceutsku mješavinu **koja je naznačena time da** sadrži spoj iz zahtjeva 1, i farmaceutski prihvatljiv prijenosnik.

73. Metodu za tretiranje ili sprječavanje raka kod pacijenta, **a koja je metoda naznačena time da** uključuje davanje pacijentu, koji ima potrebu za takvim tretmanom ili sprječavanjem, terapeutske učinkovite količine spoja iz zahtjeva 1.

74. Metodu za tretiranje ili sprječavanje raka kod pacijenta, **a koja je metoda naznačena time da** uključuje davanje pacijentu, koji ima potrebu za takvim tretmanom ili sprječavanjem, terapeutske učinkovite količine farmaceutske mješavine iz zahtjeva 71.

75. Metodu za dokazivanje raka kod pacijenta, **a koja je metoda naznačena time da** uključuje davanje pacijentu, kojemu je potrebno takvo dokazivanje, dijagnostički učinkovite količine farmaceutske mješavine iz zahtjeva 71.

SAŽETAK

5 Ovaj se izum općenito odnosi na peptidne analoge spoja Ac-PHSCN-NH₂, a koji su usmjereni na tumorske i endotelne stanice, te imaju protutumorsko, antiangiogenično i antimetastatsko djelovanje, zatim na metode izrade tih peptida, njihove mješavine i metode korištenja tih peptida i njihovih farmaceutskih mješavina, za tretiranje, sprječavanje i dokazivanje bolesti karakteriziranih tumorskim rastom, metastazama i angiogenezom. Peptidni analozi mogu služiti, među ostalim, kao prijenosnici radioaktivnosti, PET-aktivnih spojeva, toksina, fluorescentnih molekula i PEG molekula.