



(19) REPUBLIKA HRVATSKA
DRŽAVNI ZAVOD ZA
INTELEKTUALNO VLASNIŠTVO



(21) Broj prijave:

HR P20010833A A2

HR P20010833A A2

(12) PRIJAVA PATENTA

(51) Int. Cl.⁷: **A 61 K 49/00**
C 09 B 23/02
C 09 B 23/00
C 09 B 23/08

(22) Datum podnošenja prijave patenta u HR: 09.11.2001.

(43) Datum objave prijave patenta u HR: 31.08.2004.

(86) Broj međunarodne prijave: PCT/EP00/02697

Datum podnošenja međunarodne prijave 28.03.2000.

(87) Broj međunarodne objave: WO 00/61194

Datum međunarodne objave 19.10.2000.

(31) Broj prve prijave: 199 17 713.9 (32) Datum podnošenja prve prijave: 09.04.1999. (33) Država ili organizacija podnošenja prve prijave: DE

(71) Podnositelj prijave:

**Institut fuer Diagnostikforschung GmbH an der freien Universtitaet
Berlin, Spandauer Damm 130, 14050 Berlin, DE**

(72) Izumitelji:

Kai Licha, Bornimer Strasse 17a, 14612 Falkensee, DE
Andreas Becker, Lindenring 19a, 16761 Hennigsdorf, DE
Wolfhard Semmler, Im Neuenheimer Feld 280, 69120 Heidelberg, DE
Bertram Wiedenmann, Kommandantenstrasse 96a, 12205 Berlin, DE
Carsten Hessenius, Hermannstrasse 198, 12049 Berlin, DE
Rudolf Volkmer-Engert, Dubliner Strasse 8, 13349 Berlin, DE
Jens Schneider-Mergener, Hohenzollerndamm 7, 10717 Berlin, DE
Sarah Bhargava, Lichtenrader Strasse 32, 12049 Berlin, DE

(74) Punomoćnik:

Dragutin SIKIRIĆ, Zagreb, HR

(54) Naziv izuma:

**KONJUGATI KRATKOLANČANIH PEPTIDA I BOJA KAO KONTRASTNA SREDSTVA U
OPTIČKOJ DIJAGNOSTICI**

(57) Sažetak: Izum se odnosi na spojeve za tumorsku dijagnostiku, koji se sastoje od konjugata boja sa kratkolančanim peptidima, koji su izvedeni od vazoaktivnog intestinalnog peptida, od somatostatina ili od neurotenzina, primjene tih spojeva kao optičkih dijagnostika i istih spojeva koji sadrže dijagnostička sredstva.

HR P20010833A A2

OPIS IZUMA

Izum se odnosi na spojeve, koji se primjenjuju u tumorskoj dijagnostici, a sastoje se od konjugata boja s kratkolančanim peptidima, koji su izvedeni od vazoaktivnih intestinalnih peptida, od somatostatina ili od neurotenzina, primjenu tih spojeva kao optičkih dijagnostika i dijagnostičkih sredstava, koja sadrže takve spojeve.

Promjene uzrokovane oboljenjima, odražavaju se na celularnoj razini često kao jedno stanje suprotno od normalnog, a manifestira se u izmjenjenoj raspodjeli receptora ili opetovanoj ekspresiji. Te razlike mogu biti kako kvantitativne prirode (npr. količina transferin receptora na proliferirajuće stanice) tako i kvalitativne prirode (npr. ekspresija vaskularnog endotelijskog faktora rasta, VEGF). Do sada se upotreba u prikazu jedne patološke receptorne ekspresije ili raspodjele, zbog potrebne senzitivnosti postupka detekcije, koristila isključivo u radiodijagnostici.

Heptahelikalni receptori su ciljne molekule za mnoge farmakološke djelotvorne tvari (npr. β -blokeri, H₂ blokeri kiselina, antihistaminici). Pored farmaceutske primjene, isključivo su u upotrebi radioaktivno markirani agonistički ligandi tih receptora, koji se koriste dijagnostički za tzv. receptornu scintigrafiju za in-vivo detekciju i lokalizaciju tumora. Pri tom se koristi mehanizam receptor-posredujuća endocitoza, npr. preko somatostatin receptora, koji je pojačano eksprimiran na neuroendokrinim tumorima. Klinički dopušteno za Scintigrafsku rutinsku dijagnostiku je somatostatin analog ¹¹¹In-DTPA-pentetreotid (Octreoscan®);

Literatura: J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. 37, 1079-82, 1990, J. Nucl. Med. 32, 1184-9, 1991.; J. Nucl. Med. 33, 652-8, 1992; Digestion 3, 54-9, 1994., J. Clin. Invest. 93, 1321-5, 1994, Metabolism 45, 21-3, 1996.

Drugi način korištenja radioaktivno markiranih VIP i VIP-analoga, koji se vežu na VIP-receptor. VIP-receptor će biti od širokog spektra tumora pojačano eksprimiran (između ostalog od adenokarcinoma).

WO 96/30055 opisuje radiodijagnostičke i radioterapeutske reagense, posebice VIP-receptorvezujuće peptide, koji su radioaktivno markirani i mogu se koristiti za radio dijagnostiku i terapiju. S posebnom prednošću su opisani VIP-receptorvezujući, s Tc-99m markirani peptidi za scintigrafiju.

Daljnja literatura: Cancer Research 54, 690-700, 1994; Endocrinology 136, 2662-80, 1994, J. Nucl. Med. 40, 353-361, 1999.

Svi opisani dijagnostički načini primjene, koji se baziraju na somatostatin-receptoru, su radiodijagnostički načini primjene (scintigrafija s ¹²³I, ¹²⁵I, ¹¹¹In ili ^{99m}Tc-markiranim peptidima).

Literatura: EP 588754, US 5650134; US 6520675; US 5225180; WO 96/23527; J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. 37, 1083-87, 1990, Lancet 242-4, 1989, J. Nucl. Med. 39, 1913-17, 1998.

Do sada nisu bili poznati fluorescentno markirani peptidi, koji su konjugirani s bojama, koje omogućuju jednu in-vivo-fluorescenc detekciju tumora (Photochem. Photobiol. 68, 603-632, 1998.).

Izum ima zadaću, predstaviti nove spojeve, koji omogućuju senzitivnu dijagnozu tumora, kroz detekciju fluorescentnog zračenja, za korištenje receptor-specifičnog spajanja spojeva na ciljne organe. Pri tom trebaju specijalne molekule boje, koje su pripojene na biomolekule, dati jedan visokosenzitivno detektirajući fluorescirajući signal.

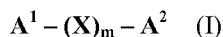
Zadaća će biti riješena pripremom spojeva, koji su kovalentno vezani na kratkolančane peptide. Ti konjugati posjeduju visoki afinitet prema spajanju sa heptahelikalnim receptorima, specijalno somatostatin receptor, VIP-receptor (vazoaktivni intestinalni receptor) i neurotenzin receptor i biti će isto tako preko receptor-posredovane endocitoze intracelularno primljen. Izumom predloženi spojevi su primjerjeni za tehnički jednostavnu, bezopasnu optičku dijagnostiku tumorskih stanica i tumorskog tkiva, koja somatostatin receptore, VIP-receptore ili neurotenzin receptore u usporedbi sa zdravim stanicama jače eksprimiraju. Posebice su za to primjerjeni spojevi za fluorescentnu dijagnostiku, a od posebne prednosti su za fluorescentno-endoskopsku dijagnostiku utrobnih organa, kao ezofagus, cerviks, kolon i bronhije različitih tipova tumora, kao npr. adenokarcinom, neuroendokrini tumori ili duktalni pankreatski tumori.

Posebno se prednost daje bojama, koje su specifične po tome, da ispunjavaju posebne fotofizikalne i kemijske zahtjeve. S foto-fizikalnog aspekta, moraju boje imati visoki koeficijent apsorpcije, da bi mogle dati efektivan signal, čak i kod malih koncentracija tkiva. Apsorpcijski maksimum moraju, slobodnim odabirom, jedno široko spektralno područje pokrivati. Tako je za detekciju u dubljim slojevima tkiva (više centimetara ispod površine kože) esencijalno spektralno područje između 600 i 900 nm, dok su za površinsku detekciju dovoljne apsorpcijske valne duljine od 400 do 600 nm. S kemijskog aspekta moraju boje posjedovati visoki fotosenzibilitet i nikakve pojave raspadanja (photobleaching) za vrijeme poticaja (snimanja). Boje moraju biti uklopive, kao građivi elementi u postupku sinteze sintetičke čvrste faze peptida i time biti stabilni u normalnim uvjetima sinteze, da bi time bio zadovoljen jednostavan, cijenom pristupačan

postupak proizvodnje strukturno definiranih konjugata peptida i boja s čvrstim stehiometrijskim odnosom između boje i peptida. Postavljeni zahtjevi su najbolje ispunjeni kod polimetin boje, posebice cijanin, merocijanin, oksonol i skvarilij.

Predmet izuma su stoga

Konjugati peptid-polimetin-boja opće formule (I)



pri čemu

X za α , β ili γ -aminokiseline ili D ili L-konfiguraciju i

m za broj od 5 do 30 stoji,

pri čemu rezultirajuća amino sekvenca $(X)_m$ je ravnolančane naravi ili preko disulfidne veze između cisteina ili homocisteina ili amidno, između N i C-terminusa ciklizirana i za aminosekvencu vazoaktivnog intestinalnog peptida (VIP), somatostatina ili neurotenzina ili za fragmente, djelomične sekvence, derivate ili analoge VIP, somatostatina ili neurotenzina stoji,

A^1 za jedan atom vodika, jedan acetilni ostatak ili jedan alkilni ostatak s do 10 C-atoma, koji isto tako mogu biti supstituirani s 1 do 3 karboksilne skupine i/ili 1 do 6 hidroksi-skupine ili jedan poli(oksietilen)ostatak s 2 do 30 $-CH_2CH_2O-$ jedinica ili jedna molekula boje iz klase polimetinske boje, koja pokazuje jedno apsorpcijsko područje od 380 do 1200 nm,

A^2 za hidroksi skupinu, jednu amino skupinu ili jednu molekulu boje iz klase polimetinske boje, koja pokazuje najmanje jedan apsorpcijski maksimum u području od 380 do 1200 nm, stoji

pod uvjetom, da najmanje jedan od ostataka A^1 ili A^2 predstavlja jednu molekulu boje iz klase polimetinskih boja, koje najmanje jedan apsorpcijski maksimum u području od 380 do 1200 nm pokazuju,

pri čemu, za slučaj, da A^1 i/ili A^2 jedna molekula boje iz klase polimetinskih boja, koje najmanje jedan apsorpcijski maksimum, u području od 380 do 1200 nm pokazuju, predstavlja, A^1 je povezana na jednu N-terminalnu amino skupinu, a A^2 na jednu amino skupinu aminokiseline lizin ili na jednu hidroksi skupinu aminokiseline serin na bilo kojoj poziciji unutar sekvence aminokiselina $(X)_m$,

i njihove fiziološki podnošljive soli.

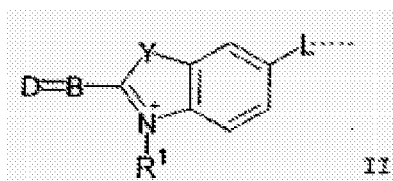
Fragmenti, dijelovi sekvenci, derivati ili analozi navedenih peptida stoje između ostalog za skraćene sekvence aminokiselina, izmjene pojedinih ili više aminokiselina nasuprot odgovarajućih D-aminokiselina, invertiranih sekvenci i kombinacija navedenih oznaka.

Fragmenti, dijelovi sekvenci, derivati ili analozi navedenih peptida mogu isto tako sadržavati neprirodne aminokiseline, kao npr. naftalanin, cikloheksilalanin, norleucin, norvalin, α -aminoadipinsku kiselinu, α -amino maslačnu kiselinu, β -alanin, β -cikloheksilalanin, ornitin, sarcosin ili 6hidroksilizin.

Posebno preferirani izvedeni oblici izuma su spojevi opće formule I, koji se time odlikuju, da molekula boje A^1 i/ili A^2 stoji za jedan cijanin, skvarilij, krokonij, merocijanin ili oksonol. Te boje pripadaju klasi polimetinskih boja i imaju gore navedene prednosti.

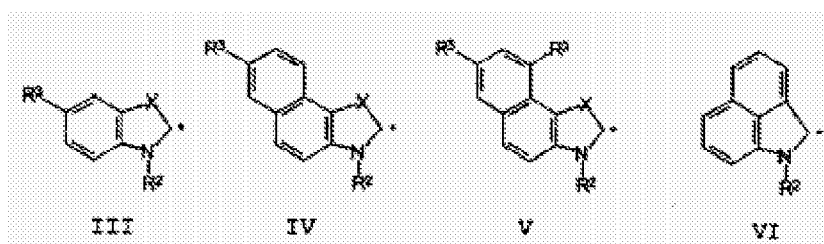
Daljnji preferirani, izumom predloženi spojevi opće formule I odlikuju se time da,

je molekula boje A^1 i/ili A^2 za jedan cijanin odnosno skvarilij (boja) opće formule II

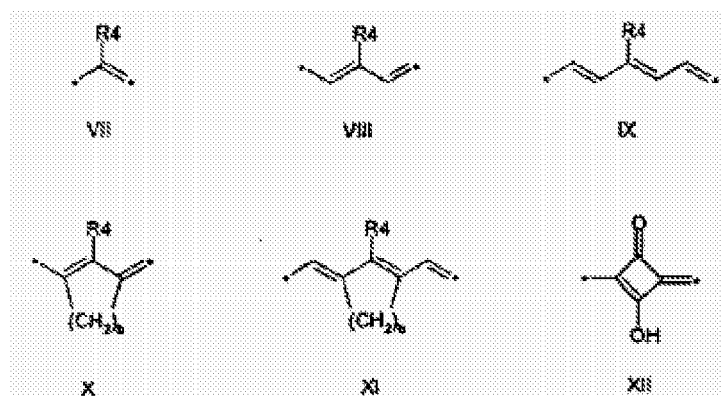


pri čemu

D za jedan fragment koji odgovara općoj formuli III do VI, pri čemu pozicija označena zvjezdicom označava povezanost sa B, stoji,



B za fragment odgovarajuć općoj formuli VII do XII



R¹ i R² za E¹, R³ za jedan fluor, klor, brom, jod- atom ili jednu nitro skupinu ili za jedan ostatak -COOE¹, -CONE¹E², -NHCOE¹, -NHCONHE¹, -NE¹E², -OE¹, -OSO₃E¹, SO₃E¹, -SO₂NHE¹, -E¹,

pri čemu E¹ i E² neovisno međusobno za jedan atom vodika, jedan C₁-C₄-sulfoalkilni lanac, jednu zasićenu ili nezasićenu, razgranjen ili nerazgranjen C₁-C₅₀-alkilni lanac, pri čemu lanac ili dijelovi lanca isto tako jedan ili više aromatične ili zasićene ciklične C₅-C₆- ili biciklične jedinice tvoriti

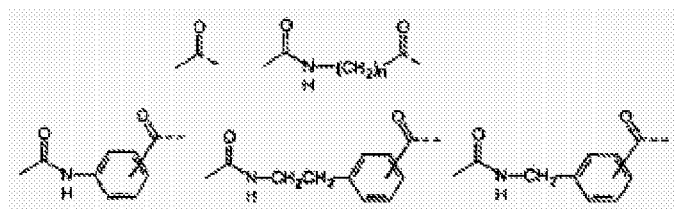
mogu, stoje i pri tom C₁-C₅₀-alkilni lanac od 0 do 15 atoma kisika i/ili od 0 do 3 karbonilne skupine su prekinute i/ili su s 0 do 5 hidroksilnih skupina supstituirani, stoje,

R₄ za jedan atom vodika, za jedan fluor, klor, brom, jod-atom ili za jedan razgranjeni ili ravnolančani C₁-C₁₀-alkilni lanac, stoji,

b jedan broj 2 ili 3 označava,

X i Y neovisno međusobno O, S, Se, -CH=CH- ili C(CH₃)₂ označuje,

L za jednu skupinu odgovarajuće slijedeće formule



pri čemu n označava jedan broj od 1 do 10, stoji.

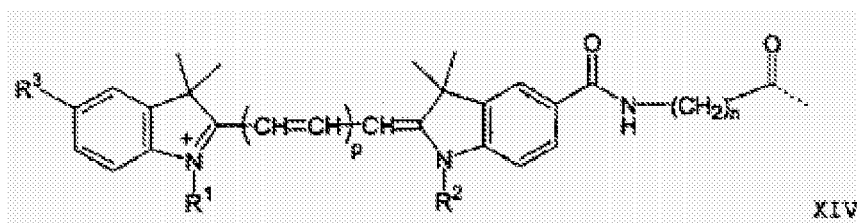
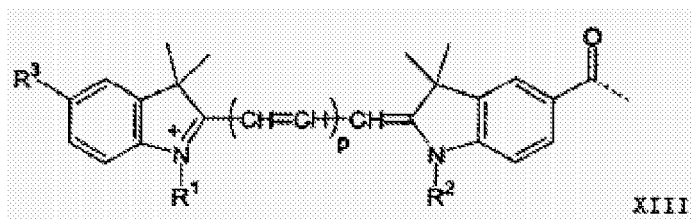
(Kod gore navedene formule označava u dijelu molekule lijevo naznačena provučena linija vezu prema osnovnom kosturu boje, a isprekidana linija u dijelu molekule desno, vezu prema peptidu.)

Iz klase polimetinskih boja su cijanin boje, npr. one koje se baziraju na indol-strukturi, indokarbo-, indodikarbo- i indotrikarbecijanin su posebno od prednosti. Takve strukture su karakteristične po tome što pokazuju visoku kemijsku i fotokemijsku stabilnost. Preko povoljnu sintezu se mogu dobiti derivati, koji proizvoljno apsorbiraju između 400 i 1000

nm i fluoresciraju, kroz supstituciju sa sličnim linkovima i funkcionalnim skupinama, primjerice s karboksilnim skupinama, mogu biti pripojeni na peptide i posjeduju visoku topivost, primjerice preko sulfonatnih skupina. Nasuprot u literaturi poznatih cijanin boja, posjeduju izumom predloženi, primjenjivani spojevi samo jednu reaktivnu skupinu, koja omogućuje jedno stehiometrijski definirano spajanje na peptid u tijeku sinteze smole konjugata.

Posebno cijenjeni izvedbeni oblici izumom predloženih spojeva opće formule I odlikuju se time da,

- molekula boje A¹ i/ili A² za jedan indokarbocijanin-, jedan indodikarbocijanin- ili jednu indotrikarbocijanin boju stoji,
- molekula boje A¹ i/ili A² za jedan indokarbocijanin-, jedan indodikarbocijanin- ili jedan indotrikarbocijaninsku boju opće formule XIII ili XIV



pri čemu

p za 1, 2 ili 3

n za jedan broj od 1, 2, 3, 4 ili 10 stoji,

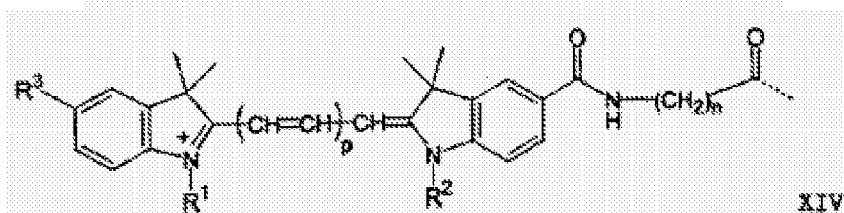
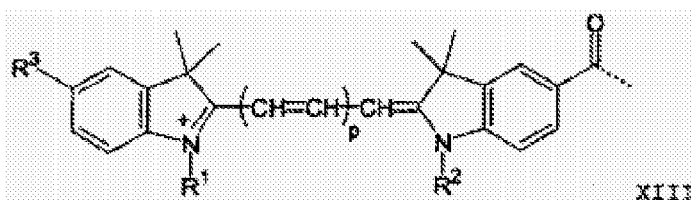
R¹ i R² neovisno međusobno za jedan 4-Sulfobutil-, 3-sulfopropil-, 2-sulfoetil-, 3-metil-3-sulfopropil-, metil-, etil- ili propil ostatak stoji

I

R³ za vodik, jedan klor, brom, jod atom ili jednu nitroskupinu ili za jedan ostatak -COOE¹, -CONE¹E², -NHCOE¹, -NHCONHE¹, -NE¹E², -OE¹, -OSO³E¹, -SO³E¹, ---SO²NHE¹,

pri čemu E¹ i E², međusobno neovisno, za jedan atom vodika ili za jedan metil, etil ili jedan C₃-C₆-alkil ostatak, koji od 0 do 2 atoma kisika i/ili od 0 do 1 karbonilne skupine je prekinut i/ili s 0 do 5 hidroksilnih skupina supstituiran, ili za jedan poli(oksietilen)glikol ostatak s 2 do 30 -CH₂CH₂O-jedinica stoji,

- da molekula boje A¹ i/ili A² za jedan indokarbocijanin-, jedan indodikarbocijanin- ili jedan indotrikarbocijanin boju opće formule XIII ili XIV



pri čemu

p za 1, 2 ili 3

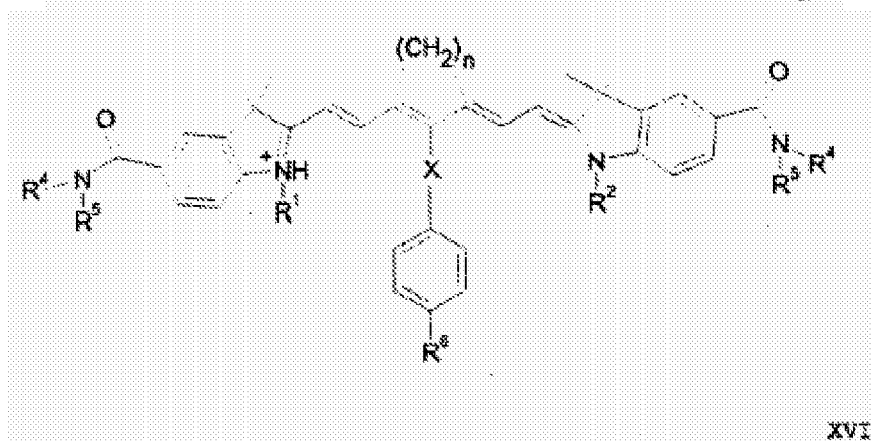
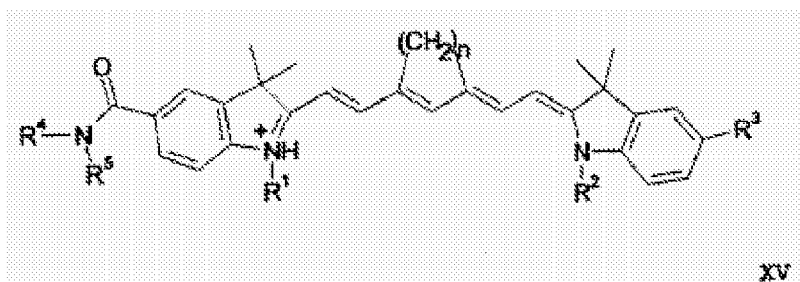
n za 1, 2 ili 4,

R¹ i R² neovisno međusobno za jedan 4-sulfobutil- ili 3-sulfopropil ostatak,

R³ za atom vodika ili za jedan -COOE¹ ostatak ili -CONHE¹,

pri čemu E¹ jedan atom vodika ili jedan metil-, etil- ili jedan C₃-C₆-alkil ostatak, koji je od 0 do 2 atoma kisika i/ili od 0 do 1 karboksilne skupine prekinut i/ili s 0 do 5 hidroksilnih skupina supstituiran, ima značenje,

- da jedna molekula boje A¹ i/ili A2 za jednu indotrikarbocijanin boju opće formule XV ili XVI stoji:



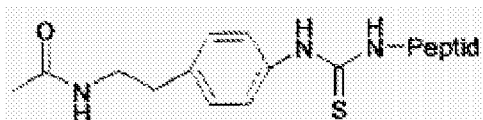
pri čemu

n za 2 ili 3 stoji,

R¹ i R² neovisno međusobno jedan 4-sulfobutil-, 3-sulfopropil- ili 2-sulfoetilostatak predstavlja,

R³ za jedan ostatak -CONH-peptid, -CONH-(CH₂)_m-CONH-peptid, -CONH-(CH₂)_n-NH-CS-NH-peptid ili -CONH-(CH₂)_n-NHCO-CH₂-peptid s m=1 do 10 i n=2 ili 3, stoji,

ili slijedeću skupinu predstavlja:



R⁴ i R⁵ neovisno međusobno za jedan atom vodika, jedan metilni ostatak ili jedan hidroksilirani alkilni ostatak kao npr. 2-hidroksietil, 3-hidroksipropil, 2,3-dihidroksipropil, 1,3-dihidroksi-2-propil, 2,3,4-trihidroksibutil, 1,3,4-trihidroksi-2-butyl, 2,3,4,5,6-pentahidroksiheksil, stoji

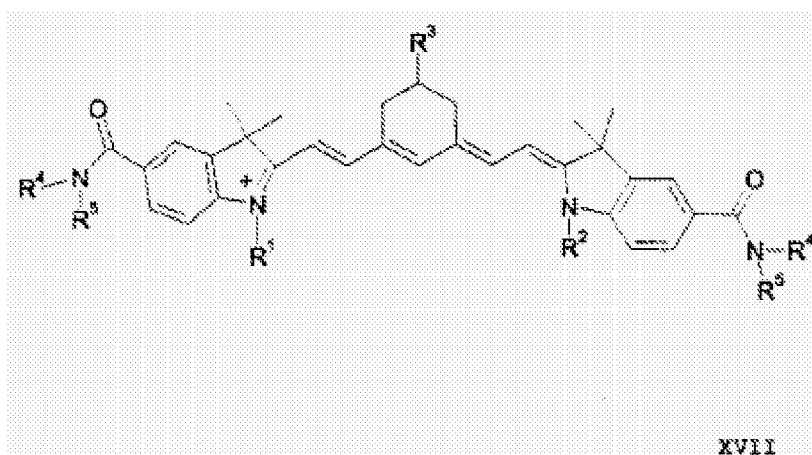
R⁶ za jednu od slijedećih skupina stoji:

-(CH₂)_m-CONH-peptid s m=0 do 2,

-(CH₂)_m-NH-CS-NH-peptid s m=0 do 2,

i X za jedan atom kisika ili jedan atom sumpora stoji;

- da molekula boje A1 i/ili A2 za jednu indotrikarbocijanin boju opće formule XVII stoji:



pri čemu

R^1 i R^2 neovisno međusobno jedan 4-sulfobutil- ili 3-sulfopropil ostatak predstavljaju,

R^3 za jedan ostatak $-\text{CONH-peptid}$, $\text{CONH}-(\text{CH}_2)_m-\text{CONH-peptid}$, $-\text{CONH}-(\text{CH}_2)_n-\text{NH-CS-NH-peptid}$ ili

$-\text{CONH}-(\text{CH}_2)_n-\text{NHCO-CH}_2\text{-peptid}$ s $m=1$ do 10 i $n=2$ ili 3, stoji

ili slijedeću skupinu predstavlja:



i R^4 i R^5 neovisno međusobno za jedan atom vodika ili jedan metilni ostatak ili jedan hidroksilirani alkilni ostatak, kao npr. 2-hidroksietil, 3- hidroksipropil, 2,3-dihidroksipropil, 1,3-dihidroksi-2-propil, 2,3,4-trihidroksibutil, 1,3, 4-trihidroksi-2-butil, 2,3,4,5,6-pentahidroksiheksil, stoji.

Primjena antitijela markiranih bojom pri detekciji tumora je poznata u literaturi (J. Cell. Pharmacol. 3, 141-145, 1992; Cancer Immunol. Immunother. 41, 257-63, 1995; Cancer Research 54, 2643-9, 1994, Biotechnol. Prog. 13, 649-658, 1997).

U suprotnosti s tim sadrže izumom predloženi spojevi kao biomolekule niskomolekularne peptide i derivate peptida, koji prednosti antitijela, kao visoka mogućnost spajanja na ciljane molekule, pokazuju, bez da je pri tom dijagnostički potencijal preko jedne nepovoljne farmakokinetike (dugo vrijeme sedimentacije krvi, alergijski nepoželjni učinci - imunogenitet) ograničen.

Biološki i farmakološki zahtjevi na peptidne sekvence su tome odgovarajuće zadovoljavajući plazmabilitet kod bržeg sakupljanja u ciljanom tkivu i istovremeno brza eliminacija iz ostatka tijela, primjerice preko renalnog puta izlučivanja.

Iznenadujuće je da je pri tom otkriveno, da peptidna sekvenca, koja sadrži najmanje 5 aminokiselina na strani C-terminusa VIP-sekvence i na kojoj je povezana boja za fluorescentnu dijagnostiku, posjeduje jednu s nativnim VIP usporedivim snimkama u tumorskih stanica. Obzirom na to otkriveno je, da preko ugradnje najmanje jedne D-aminokiseline ili izmjenom preko najmanje jedne D-aminokiseline, stabilnost plazme može biti značajno povećan. Na primjeru jedne potpune izmjene svih L- s D-aminokiselinama u jednom VIP-vezujućem peptidnom konjugatu boja, moglo se dokazati, da je odlika vezivanja i prodiranja u stanice ostala neizmjenjena.

Daljnje posebnosti izumom predloženih spojeva opće formule I, kojima se daje prednost, odlikuju se time,

da $(X)_m$ za sekvencu aminokiselina nativnog, u prirodi poznatog, humanog vazoaktivnog intestinalnog peptida, odgovara

HSDAVFTDNYTRLEKQMAVKKYLNSILN

ili za fragmente, dijelove sekvenci, derivate ili analoge vazoaktivnih intestinalnih peptida, koji se sastoje od 5 do 30 aminokiselina, stoje,

- da $(X)_m$ za aminosekvencu somatostatinu odgovarajuću

AGCKNFFWKTFTSC

ili za fragmente, dijelove sekvenci, derivate ili analoge somatostatina, koji se sastoje od 5 do 20 aminokiselina stoje,

- 5 - da (X)_m za sekvencu aminokiselina odgovarajuću neotenzinu piroglutaminska kiselina-LYENKPRPYIL

ili za fragmente, dijelove sekvenci, derivate ili analoge neurotenzina, koji se sastoje od 5 do 20 aminokiselina, stoje,

- 10 - da kao fragmenti, dijelovi sekvenci, derivati ili analogi vazoaktivnog intestinalnog peptida (VIP) slijedeća sekvenca aminokiselina je odabrana:

RLRKQMAVKKYLNSILN	RLRKQMAVKKYLNSIL	RLRKQMAVKKYLNSI
LRKQMAVKKYLNSILN	LRKQMAVKKYLNSIL	LRKQMAVKKYLNSI
RKQMAVKKYLNSILN	RKQMAVKKYLNSIL	RKQMAVKKYLNSI
KQMAVKKYLNSILN	KQMAVKKYLNSIL	KQMAVKKYLNSI
QMAVKKYLNSILN	QMAVKKYLNSIL	QMAVKKYLNSI
MAVKKYLNSILN	MAVKKYLNSIL	MAVKKYLNSI
AVKKYLNSILN	AVKKYLNSIL	AVKKYLNSI
RLRKQMAVKKYLNS	RLRKQMAVKKYLN	RLRKQMAVKKYL
LRKQMAVKKYLNS	LRKQMAVKKYLN	LRKQMAVKKYL
RKQMAVKKYLNS	RKQMAVKKYLN	RKQMAVKKYL
KQMAVKKYLNS	KQMAVKKYLN	KQMAVKKYL
QMAVKKYLNS	QMAVKKYLN	QMAVKKYL
MAVKKYLNS	MAVKKYLN	MAVKKYL
AVKKYLNS	AVKKYLN	AVKKYL,

- da kao analogi VIP je odabrana slijedeća sekvenca:

15

FSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN

ISDAVFTDNY	TRLRKQMAVK	KYLNSILN
LSDAVFTDNY	TRLRKQMAVK	KYLNSILN
HFDAVFTDNY	TRLRKQMAVK	KYLNSILN
HHDAVFTDNY	TRLRKQMAVK	KYLNSILN
HIDA VFTDNY	TRLRKQMAVK	KYLNSILN
HLEDAVFTDNY	TRLRKQMAVK	KYLNSILN
HMDAVFTDNY	TRLRKQMAVK	KYLNSILN
HQDAVFTDNY	TRLRKQMAVK	KYLNSILN
HTDAVFTDNY	TRLRKQMAVK	KYLNSILN
HVDAVFTDNY	TRLRKQMAVK	KYLNSILN
HWDAVFTDNY	TRLRKQMAVK	KYLNSILN
HYDAVFTDNY	TRLRKQMAVK	KYLNSILN
HSAAVFTDNY	TRLRKQMAVK	KYLNSILN
HSEAVFTDNY	TRLRKQMAVK	KYLNSILN
HSEAVFTDNY	TRLRKQMAVK	KYLNSILN
HSHAVFTDNY	TRLRKQMAVK	KYLNSILN
HSAVFTDNY	TRLRKQMAVK	KYLNSILN
HSLAVFTDNY	TRLRKQMAVK	KYLNSILN
HSMVFTDNY	TRLRKQMAVK	KYLNSILN
HSWVFTDNY	TRLRKQMAVK	KYLNSILN
HSDVFTDNY	TRLRKQMAVK	KYLNSILN
HSDGVFTDNY	TRLRKQMAVK	KYLNSILN
HSDMVFTDNY	TRLRKQMAVK	KYLNSILN
HSDQVFTDNY	TRLRKQMAVK	KYLNSILN
HSDSVFTDNY	TRLRKQMAVK	KYLNSILN
HSDWVFTDNY	TRLRKQMAVK	KYLNSILN
HSDYVFTDNY	TRLRKQMAVK	KYLNSILN
HSDAPFTDNY	TRLRKQMAVK	KYLNSILN
HSDAIFTDNY	TRLRKQMAVK	KYLNSILN
HSDALFTDNY	TRLRKQMAVK	KYLNSILN
HSDAMFTDNY	TRLRKQMAVK	KYLNSILN
HSDATFTDNY	TRLRKQMAVK	KYLNSILN
HSDAWFTDNY	TRLRKQMAVK	KYLNSILN
HSDAYFTDNY	TRLRKQMAVK	KYLNSILN
HSDAVKTDNY	TRLRKQMAVK	KYLNSILN
HSDAVFVDNY	TRLRKQMAVK	KYLNSILN

HSDAVFTDNY	TLRLKQMAIK	KYLNSILN
HSDAVFTDNY	TLRLKQMALK	KYLNSILN
HSDAVFTDNY	TLRLKQMAVR	KYLNSILN
HSDAVFTDNY	TLRLKQMAVK	KYLNSILN
HSDAVFTDNY	TLRLKQMAVK	WYLNSILN
HSDAVFTDNY	TLRLKQMAVK	KFLNSILN
HSDAVFTDNY	TLRLKQMAVK	KWLNSILN
HSDAVFTDNY	TLRLKQMAVK	KYLASILN
HSDAVFTDNY	TLRLKQMAVK	KYLFSILN
HSDAVFTDNY	TLRLKQMAVK	KYLISILN
HSDAVFTDNY	TLRLKQMAVK	KYLMASILN
HSDAVFTDNY	TLRLKQMAVK	KYLSSILN
HSDAVFTDNY	TLRLKQMAVK	KYLVASILN
HSDAVFTDNY	TLRLKQMAVK	KYLWSILN
HSDAVFTDNY	TLRLKQMAVK	KYLXASILN
HSDAVFTDNY	TLRLKQMAVK	KYLNASILN
HSDAVFTDNY	TLRLKQMAVK	KYLNWILN
HSDAVFTDNY	TLRLKQMAVK	KYLNYILN
HSDAVFTDNY	TLRLKQMAVK	KYLNSILN
HSDAVFTDNY	TLRLKQMAVK	KYLNSSLN
HSDAVFTDNY	TLRLKQMAVK	KYLNSWLN
HSDAVFTDNY	TLRLKQMAVK	KYLNSYLN
HSDAVFTDNY	TLRLKQMAVK	KYLNSIPN
HSDAVFTDNY	TLRLKQMAVK	KYLNSIIN
HSDAVFTDNY	TLRLKQMAVK	KYLNSIWN
HSDAVFTDNY	TLRLKQMAVK	KYLNSILW

- da kao analog VIP-u je jedan spoj, prema slijedećoj formuli odabran:

ESDAVFTX¹X²Y X³ELREQMAVK KYINSLIN

5

pri čemu X^1 , X^2 i X^3 može predstavljati bilo koju aminokiselinu,

da 2 do m aminokislina neovisno međusobno, nasuprot njene bilo aminokiseline ili nasuprot druge L- ili D-aminokiseline može biti izmjenjena, pri čemu ista ima gore navedeno značenje,

10

- da najmanje jedna aminokiselina (X)_m neovisno međusobno, za drugu, neprirodnu aminokiselinu ili derivat aminokiseline može biti zamjenjena,
- da najmanje jedna aminokiselina (X)_m neovisno međusobno, za drugu, neprirodnu aminokiselinu ili derivat aminokiseline, kao. npr. naftalanin, cikloheksilalanin, norleucin, norvalin, α-aminoadipinska kiselina, α-aminomasična kiselina, β-alanin, β-cikloheksilalanin, ornitin, sarkozin ili 6-hidroksilizin, može biti zamjenjena
- da kao analog VIP-u, jedan spoj, prema slijedećoj formuli, je odabran:

X¹SDAVX²TDNX³TRLRKQMAVK KX⁴LN\$ILN.

pri čemu X^1 , X^2 , X^3 i X^4 nisu prirodne aminokiseline ili derivati aminokiselina, kao npr. naftalanin, cikloheksilalanin, norleucin, norvalin, α -aminoadipinska kiselina, α -aminomaslačna kiselina, β -alanin, β -cikloheksilalanin, ornitin, sarkozin ili 6-hidroksilizin, može predstavljati,

20

- da su neke aminokiseline (X_m) za njihove određene oblike D-aminokiseline zamjenjene
- da kao fragmenti, dijelovi sekvenci, derivati ili analoga vazoaktivnih intestinalnih peptida retrosintetičkih sekvenci aminokiseline, kod kojih 2 do m aminokiseline su izmijenjene za neke D-aminokiseline.

25 su odabrane, pri čemu imaju gore navedeno značenje,

- da kao fragmenti, dijelovi sekvenci, derivati ili analoga vazoaktivnih intestinalnih peptida su odabrane slijedeće sekvence aminokiselina:

rlrkqma ~~v~~ kkyl ~~n~~ siln	rlrkqma ~~v~~ kkyl ~~n~~ sil	rlrkqma ~~v~~ kkyl ~~n~~ si
lrkqma ~~v~~ kkyl ~~n~~ siln	lrkqma ~~v~~ kkyl ~~n~~ sil	lrkqma ~~v~~ kkyl ~~n~~ si
rkqma ~~v~~ kkyl ~~n~~ siln	rkqma ~~v~~ kkyl ~~n~~ sil	rkqma ~~v~~ kkyl ~~n~~ si
kqma ~~v~~ kkyl ~~n~~ siln	kqma ~~v~~ kkyl ~~n~~ sil	kqma ~~v~~ kkyl ~~n~~ si
qma ~~v~~ kkyl ~~n~~ siln	qma ~~v~~ kkyl ~~n~~ sil	qma ~~v~~ kkyl ~~n~~ si
ma ~~v~~ kkyl ~~n~~ siln	ma ~~v~~ kkyl ~~n~~ sil	ma ~~v~~ kkyl ~~n~~ si
av ~~v~~ kkyl ~~n~~ siln	av ~~v~~ kkyl ~~n~~ sil	av ~~v~~ kkyl ~~n~~ si
RLRKQMA ~~V~~ KKY ~~N~~ SILN	RLRKQMA ~~V~~ KKY ~~N~~ SIL	RLRKQMA ~~V~~ KKY ~~N~~ SI
LRKQMA ~~V~~ KKY ~~N~~ SILN	LRKQMA ~~V~~ KKY ~~N~~ SIL	LRKQMA ~~V~~ KKY ~~N~~ SI
RKQMA ~~V~~ KKY ~~N~~ SILN	RKQMA ~~V~~ KKY ~~N~~ SIL	RKQMA ~~V~~ KKY ~~N~~ SI
KQMA ~~V~~ KKY ~~N~~ SILN	KQMA ~~V~~ KKY ~~N~~ SIL	KQMA ~~V~~ KKY ~~N~~ SI
QMA ~~V~~ KKY ~~N~~ SILN	QMA ~~V~~ KKY ~~N~~ SIL	QMA ~~V~~ KKY ~~N~~ SI
MA ~~V~~ KKY ~~N~~ SILN	MA ~~V~~ KKY ~~N~~ SIL	MA ~~V~~ KKY ~~N~~ SI
AV ~~V~~ KKY ~~N~~ SILN	AV ~~V~~ KKY ~~N~~ SIL	AV ~~V~~ KKY ~~N~~ SI

- da kao fragmenti, dijelovi sekvenci, derivati ili analoga somatostatina su slijedeće sekvence aminokiselina odabrane:

AGC <u>KNFFWKTFTSC</u>	AGC <u>KNFFWKTFTSC</u>
AGC <u>KNFFWKTFTSC</u>	AGC <u>KNFFWKTFTSC</u>
<u>CNFFWKTFTSC</u>	<u>cKNFFWKTFTSC</u>
fPYwKVPT	
fCPwKVCT	fcPwKVCT
fCYwKVCT	fcYwKVCT
fCPwKTCT	fcPwKTCT
fCYwKTCT	fcYwKTCT
D-NaI-CYwKVC	D-NaI-cYwKVC
fCYwK-Abu-C-NaI	fcywK-Abu-C-NaI

- da kao fragmenti, dijelovi sekvenci, derivati ili analoga neurotenzina su slijedeće sekvence aminokiselina odabrane:

	pGlu-LYQNKPRRPfIL	pGlu-LYENKPRRPYI	
pGlu-LYENKPRRPyIL	pGlu-LYQNKPRRPfIL	pGlu-LYENKPRRPY	
pGlu-LYQNKPRRPYIL	pGlu-LYENKPRRPwIL	pGlu-LYENKPRRP	
pGlu-LYQNKPRRPyIL	pGlu-LYENKPRRPwIL	pGlu-LYENKPRR	
pGlu-LYENKPRRPfIL	pGlu-LYQNKPRRPwIL	pGlu-LYENKPR	
pGlu-LYENKPRRPfIL	pGlu-LYQNKPRRPwIL	pGlu-LYENKP	
NKPRRPYIL	NKPRRPyIL	NKPRRPfIL	NKPRRPwIL
KPRRPYIL	KPRRPyIL	KPRRPfIL	KPRRPwIL
PRRPYIL	PRRPyIL	PRRPfIL	PRRPwIL
RRPYIL	RRPyIL	RRPfIL	RRPwIL

- 10 Terminologija opće formule I sadrži uobičajeni način označavanja sekvanca aminokiselina. N-terminus je stalno lijevo, a C-terminus desno (nesupstituiran odgovara H-(X)m-OH ili, u slučaju jednog amida, H-(X)m-NH₂. Upotrebljavane kratice od jednog slova aminokiselina mogu biti očitane u M. Bodanszky, Peptide chemistry – A practical textbook, 2nd edition, Springer-Verlag Heidelberg 1993, str 3. velika slova označuju aminokiseline s L-konfiguracijom (prirodne aminokiseline), mala slova označuju D-aminokiseline, disulfidne veze (ciklički peptidi) su preko crtica koje označuju
15 veze između odgovarajućih slova (C=cistein ili homocistein) označen. Kao retrosintetičke označuju se sekvence, kod kojih pri sintezi slijed aminokiselina u usporedbi prema danoj nativnoj sekvenci, je invertan, što znači da sinteza

započinje s početnom N-terminalnom aminokiselinom i proizvodi sekvencu prema prvobitnoj C-terminalnoj aminokiselini.

5 Analoga VIP-a biti će pomoću supstitutivne analize pokazan (pogledaj primjer 43). Posebno prednost imaju slijedeći analoga VIP-a:

His-Trp-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-
Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn
(SEQ ID NO: 1)

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Phe-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-
Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn
(SEQ ID NO: 2)

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Lys-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-
Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn
(SEQ ID NO: 3)

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Gln-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-
Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn
(SEQ ID NO: 4)

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Arg-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-
Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn
(SEQ ID NO: 5)

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Trp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-
Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn
(SEQ ID NO: 6)

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Arg-Arg-Leu-Arg-
Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn
(SEQ ID NO: 7)

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-
Lys-Gln-Met-Arg-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn
(SEQ ID NO: 8).

10 Izumom predložene supstance imaju različite prednosti u odnosu na radioaktivno markirane supstance. Fluorescentne boje mogu se bezbrojno često navesti na fluorescentnu emisiju. Ne leži nikakav kontinuirani signal, koji bi doveo do raspada s odgovarajućim vremenom poluraspada, koji leži u suštini. Odgovarajuće tome je vrijeme dijagnoze moguće
15 prema želji odabirati i isto tako prema želji često ponavljati i nije limitirano kroz poluvrijeme jednog izotopa. Pacijent nije nikakvom ionizirajućem zračenju izložen, primjenjeni snop svjetla je u primjenjenim količinama neškodljiv. Optička detekcijska tehnika omogućuje visokosenzitivnu detekciju, manje fotona i prema tome je u odnosu na senzitivitet pomoću radiodijagnostike usporediva.

20 Jedan postupak za dijagnostiku pomoću blizog infracrvenog snopa svjetla (NIR-snop svjetla) za primjenu konjugata boja biomolekula već je opisano (WO 96/17628). Kao posebna prednost pokazalo se u slučaju predloženog izuma, da su konjugati peptida u povoljnijoj količini i višoj čistoći, kroz postupak automatizirane sinteze čvrste faze, predstavljivi. Iznađujuće je da je pri tom otkriveno, da različiti spojevi indolcijanina, koji nose karboksilne skupine, kao analoga karboksilnim kiselinama, mogu biti korištena i kao N-terminus, kao što mogu biti na aminoskupinu lizina, na čvrstoj
25 komponenti (smola) nadovezana.

Nakon odcjepljenja od smole i kromatografskog pročišćavanja, dobiju se konjugati boje i peptida, stupnja čistoće > 95%. Jedan novi način vezivanja dopušta vezivanje spojeva halogenacetil-boja na aminokiseline cistein i homocistein, koje mogu zamijeniti svaku željenu aminokiselinu nativne VIP-sekvence.

- 5 Značajniji problem kod upotrebe svjetlosti za poticanje fluorescencije je ograničena dubina prodiranja svjetlosti, koja u VIS području leži u okviru submilimetra, a u NIR području može iznositi i centimetar. S obzirom na dubinu prodiranja neproblematici su postupci detekcije u površinskom sloju oboljelog tkiva, kao i mekih tkiva.

- 10 Predmet izuma su stoga mamografski postupci, endoskopski postupci i intraoperativni postupci, kod kojih pod primjenom izumom predloženih spojeva, oboljela područja tkiva, kroz detekciju na principu fluorescencije ili neapsorbirajućih zračenja, mogu biti dijagnosticirana. Poseban predmet izuma je primjena izumom predloženih spojeva u endoskopskim postupcima, kao npr. koloskopija, bronhoskopija, ezofagijalna endoskopija, kod kojih se vrši dijagnosticiranje promjena na površinskim slojevima tkiva. Primjena bijelog svjetla s direktnom vizuelnom procjenom je vrlo raširena u endoskopskoj dijagnostici. Izumom predloženi spojevi pridonose, preko izazivanja signala specifičnih
15 za pojedina tkiva jednom značajnom poboljšanju postupka, posebice kod dijagnosticiranja ranih, vizuelno nevidljivih promjena na tkivima (npr. displazije kolona).

- Otkriveno je, da se nakon raspršivanja izumom predloženih spojeva kemijski povezanih s bojama, u crijevu štakora s kemijski induciranim displazijama i karcinomom kolona, nastavnim ispiranjem i provođenjem jedne endoskopske fluorescentne dijagnostike (inicijacija 740 nm, detekcija 760 nm), mogu dokazati bolesni dijelovi tkiva kolona pomoću povišene fluorescencije.

- Predmet izuma je stoga isto tako i postupak za endoskopsku dijagnostiku, posebice gastrointestinalnog trakta, uz primjenu izumom predloženih spojeva. Pri tom se u tkiva jedna ili više supstanci, prije svega intravenozno ili topički raspršivanjem spreja impliciraju, a nakon toga se s pomoću svjetla iz odgovarajućeg spektralnog područja vrši elektronička inicijacija (podražaj) i obasjavanje primjenjene obojane supstance. Reflektirajuća ili emitirana fluorescencija obojene supstance se registrira. Prednost se pri tom daje metodama, kod kojih se tkiva na velikim površinama izlažu svjetlosnom podražaju, a fluorescencija je lokalno izazvana, koja se snima jednom CCD-kamerom ili se areali tkiva koji su u fazi razgradnje s pomoću jednog svjetlosnog prijenosnika mogu snimiti u rasteru i dobiveni signali se računalnim putem mogu prenijeti u jednu sintetičku sliku. Pri tom se fluorescencija može spektralno i/ili fazno selektivno, kao i stacionarno i/ili vremenski izdvojeno detektirati i interpretirati. Dobivene fluorescentne slike mogu se simultano s pomoću slika dobivenih bijelim svjetlom, proizvesti i za interpretaciju podataka u bilo kojem obliku međusobno koristiti.

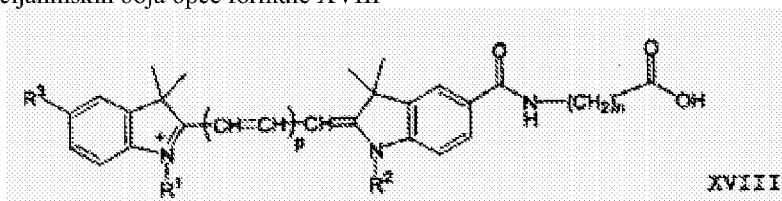
- 35 Sinteza izumom predloženih spojeva slijedi oslanjajući se na metode već poznate u literaturi. Peptidi se spravljaју sintezom na čvrstoj fazi, na polimernoj smoli. Pojednostavljeni su u struci već poznate.

Literatura: Peptide chemistry – A practical textbook (M. Bodanszky), 2nd edition, Springer-Verlag Heidelberg 1993; Anti-Cancer Drug Design 12, 145-167, 1997; J. Am. Chem. Soc. 117, 11821-2, 1995.

- 40 Bojane supstance se spravljaју odvojeno i zatim se tijekom sintetičkog spravljanja čvrste faze peptida na iste spajaju, a izumom predloženi spojevi se nakon odcjepljenja smole i pročišćavanja dobiju kao visoko čisti spojevi. Prednost pri tom imaju takve obojane tvari, koje sadrže karboksilne skupine, a one se nakon aktiviranja s pomoću reagencija s aminoskupinama peptida, posebice ε-amino skupine lizina ili N-terminalne peptid-amino skupine, budu spojene. Nadalje, prednost se daje spojevima boja s halogenalkil- ili halogenacetil ostacima, koji na tiolnim skupinama peptida, posebice na aminokiselini cisteinu ili homocisteinu, budu povezane.

- Literatura za sintezu polimetinskih boja: Bioconjugate Chem. 4, 105-111, 1993; Bioconjugate Chem. 7, 356-62, 1996; Bioconjugate Chem. 8, 751-56, 1997; Cytometry 10, 11-19, 1989 i 11, 418-30, 1990; J. Heterocycl. Chem. 33, 1871-6, 1966; J. Org. Chem. 60, 2391-5, 1995; Dyes and Pigments 17, 19-27, 1991; Dyes and Pigments 21, 227-34, 1993; J. Fluoresc. 3, 153-155, 1993; Anal. Biochem. 217, 197-204, 1994; US 4981977; US 5688966; US 5808044; WO97/42976; WO 97/42978; WO98/22146; WO 98/26077; EP 0800831.

- 55 Posebice su prikladni za spajanje s peptidima u čvrstoj fazi, su boje, koje točno jednu karboksilnu skupinu sadrže, s posebnom prednošću cijaninskih boja opće formule XVIII



pri čemu

p za 1,2 ili 3,

n za 1,2,3,4 ili 10 stoji,

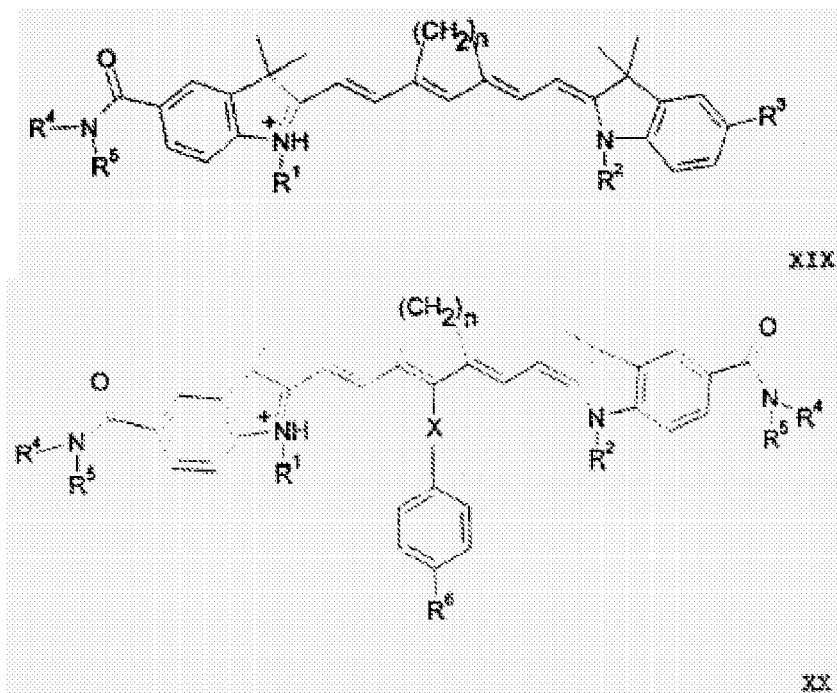
R^1 i R^2 su međusobno neovisni za jedan 4-sulfobutil-3-sulfopropil-, 2-sulfoetil-, 3-metil-3-sulfopropil-, metil-, etil-, ili propil ostatak stoji i

R^3 za vodik ili za jedan ostatak $-\text{COOE}^1$, $-\text{CONE}^1\text{E}^2$, $-\text{NHCOE}^1$, $-\text{NHCONHE}^1$, $-\text{NE}^1\text{E}^2$, $-\text{OE}^1$, $-\text{OSO}_3\text{E}^1$, $-\text{SO}_3\text{E}^1$, $-\text{SO}_2\text{NHE}^1$,

pri čemu E^1 i E^2 međusobno neovisno za jedan atom vodika

ili za jednu metil-, etil-, ili jedan C_3 - C_6 -alkilni ostatak, koji od 0 do 2 atoma kisika i/ili 0 do 5 hidroksilnih skupina je supstituiran, stoji

ili cijaninske boje opće formule XIX ili XX



pri čemu

n za 2 ili 3 stoji

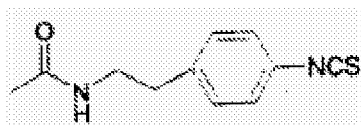
R^1 i R^2 neovisno međusobno jedan 4-sulfobutil-, 3-sulfopropil- ili 2-sulfoetil ostatak predstavlja,

R^3 za jednu $-\text{COOH}$ -skupinu ili jedan od slijedećih ostataka stoji:

$-\text{CONH}-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$ s $n=2$ ili 3,

$-\text{CONH}-(\text{CH}_2)_n-\text{NCS}$ s $n=2$ ili 3,

$-\text{CONH}-(\text{CH}_2)_n-\text{NHCO}-\text{CH}_2-\text{X}^1$ s $n=2$ ili 3 i $\text{X}^1 = \text{Cl}, \text{Br}, \text{J}$



R^4 i R^5 neovisno međusobno za jedan atom vodika, jedan metilni ostatak ili jedan hidroksilirani alkilni ostatak, kao npr. 2-hidroksietil, 3-hidroksipropil, 2,3-dihidroksipropil, 1,3-dihidroksi-2-propil, 2,3,4-trihidroksibutil, 1,3,4-trihidroksi-2-butil, 2,3,4,5,6-pentahidroksiheksil stoji,

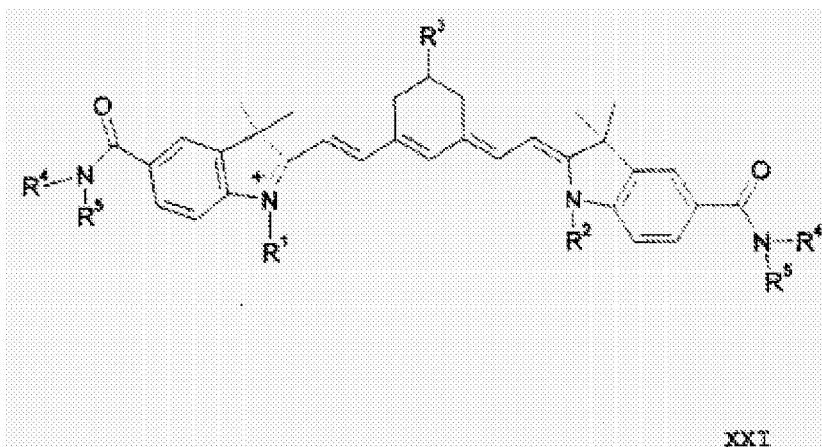
R^6 za jednu od slijedećih skupina stoji:

$-(\text{CH}_2)_m-\text{COOH}$ s $m=0$ do 2,

$-(\text{CH}_2)_m-\text{NCS}$ s $m=0$ do 2

i X za jedan atom kisika ili jedan atom sumpora stoji;

ili cijaninske boje opće formule XXI



pri čemu

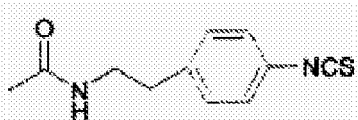
R^1 i R^2 neovisno međusobno jedan 4-sulfobutil-, 3-sulfopropil- ili 2-sulfoetil ostatak predstavljaju,

R^3 za jednu $-COOH$ -skupinu ili jedan od slijedećih ostataka stoji:

-CONH-(CH₂)_n-COOH s n=2 ili 3,

-CONH-(CH₂)_n-NCS s n=2 ili 3,

-CONH-(CH₂)_n-NHCO-CH₂-X¹ s n=2 ili 3 i X¹ = Cl, Br, J



R^4 i R^5 neovisno međusobno za jedan atom vodika, jedan metilni ostatak ili jedan hidroksilirani alkilni ostatak, kao npr. 2-hidroksietil, 3-hidroksipropil, 2,3-dihidroksipropil, 1,3-dihidroksi-2-propil, 2,3,4-trihidroksibutil, 1,3,4-trihidroksi-2-butil, 2,3,4,5,6-pentahidroksiheksil stoji.

Prednost samo jedne skupine koja se može aktivirati, kao npr. jedne karboksilne skupine ili jedne već aktivirane skupine, kao npr. jednog izotiocijanata, jedne halogenalkilne skupine ili jedne halogenacetilne skupine, sastoji se u tome, da može uslijediti jedno kemijski jedinstveno povezivanje. Halogenacetilna skupina ima jednu posebnu prednost, da jedno kemijski jedinstveno povezivanje na merkaptu skupinu cisteina ili homocisteina slijedi. Takvo vezivanje može u otopini na nevezani i od zaštitnih skupina oslobođeni peptid uslijediti. Preko aktiviranih skupina je jedno povezivanje na peptid moguće, bez da posljedične reakcije uslijede. Za povišenje topljivosti u vodi pokazuju konjugati peptid-boja na boji jedan povećani broj hidroksi skupina. Preko pozicije linkera na indol sistemu boje, može dodatno jedna zadovoljavajuća hidrofilija, preko ostataka na sulfonatnim skupinama na atomima kisika indolnog sustava biti proizvedene. Tako može jedna strukturno jedinstvena reakcija povezivanja s peptidima (vidi primjer 4 do 38 i 44 do 49) biti provedena.

Jedan daljnji predmet izuma je jedna optička dijagnostika za in-vivo-dijagnosticiranje oboljelih dijelova tkiva, koji se odlikuje time, da najmanje jedan spoj opće formule I zajedno s uobičajenim pomoćnim i/ili nosivim tvarima kao i sredstvo za razrjeđivanje sadrži.

Slijedeći primjeri objašnjavaju izum:

Primjeri 1 do 3:

Sinteza indocijanin boje 1-3 za sintetičko povezivanje čvrstih faza na amino skupinama (N-terminal ili ε-lizin) peptida

Sinteza slijedi generalno polazeći od 1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimetil-3H-indolena i 1-(4-Sulfobutil)-2,3,3-trimetil-5-karboksi-3H-indolena (Cytometry 10, 11-19, 1989, Talanta 39, 505-510, 1992).

Primjer 1:

Sinteza 1,1'-bi(4-sulfobutil)indokarbocijanin-5-karbonske kiseline, natrijeva sol (1)

0,8 g (4,0 mmol) N,N-difenilformamidina biti će u 15 ml anhidrida octene kiseline položeno i pri sobnoj temp. u manjim porcijama s 1,4 g (4,2 mmol) 1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimetil-5-karboksi-3H-indolenina pomiješano, 30 min, pri sobnoj temp. ohlađeno. Nastavno će biti 1,2 g (4,1 mmol) 1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimetil-3H-indolenina, 1,2 g (14,6 mmol) suhog natijacetata, 15 ml anhidrida octene kiseline i 6 ml octene kiseline dodano. Reakcijska mješavina se zatim zagrijava 1 sat na 120°C, tamno crvena otopina se ohladi i pomiješa sa 100 ml etera. Istaložena čvrsta tvar se odfiltrira. Slijedi jedno kromatografsko pročišćavanje na RP-Kieselgelu EUROPREP 60-30 C18, 60A, 20-45 m (eluent:

voda/MeOH, stepenasti gradijent od 0% do 70% MeOH). Frakcije koje sadrže produkt biti će najprije u rotacijskom otparivaču oslobođene metanola i nastavno liofilizirane, iskoristivost: 1,5 g (58%), crveni liofilizat.

Primjer 2:

5 Sinteza 1,1'-bi(4-sulfobutil)indodikarbocijanina-5-karbonske kiseline, natrijeva sol (2)

1,2 g (4,1 mmol) 1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimetil-3*H*-indolenina i 1,0 g (3,9 mmol) malonaldehida-bi-fenilimin-
-hidroklorida biti će u 15 ml anhidrida octene kiseline 30 min, pri 120°C miješano i tada u jednoj vodenoj kupelji do
sobne temp. ohlađeno. Nastavno će biti jedno nakon drugog 1,4 g (4,2 mmol) 1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimetil-5-karboksi
10 -3*H*-indolenina, 1,2 g (14,6 mmol) suhog natrijacetata, 15 ml anhidrida octene kiseline i 6 ml octene kiseline dodano.
Reakcijska mješavina se zagrijava 1 sat na 120°C, a tada se plava otopina ohladi i sa 100 ml etera pomiješa. Dorada i
pročišćavanje slijedi kao što je opisano u primjeru 1, iskoristivost: 1,8 g (66%), plavi liofilizat.

Primjer 3:

15 Sinteza 1,1'-bi(4-sulfobutil)indotrikarbocijanina-5-karbonske kiseline, natrijeva sol (3)

1,2 g (4,1 mmol) 1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimetil-3*H*-indolenina i 1,1 g (3,9 mmol) glutakonaldehid-dianilhidroklorida biti
će u 15 ml anhidrida octene kiseline 30 min pri 120°C miješano i tada u jednoj vodenoj kupelji na sobnu temp.
ohlađeno. Nastavno se 1,4 g (4,2 mmol) 1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimetil-5-karboksi-3*H*-indolenina, 1,2 g (14,6 mmol)
20 suhog natrijacetata, 15 ml anhidrida octene kiseline i 6 ml octene kiseline dodano. Reakcijska mješavina će se
zagrijavati 1 sat na 120°C, plava otopina ohladiti i sa 100 ml etera pomiješati. Obrada i pročišćavanje slijedi kao u
primjeru 1 opisano, iakoristivost: 1,8 g (60%), plavi liofilizat.

Strukture spojeva iz primjera 1-3 su u opisu 1 prikazane.

25

Primjeri 4 do 6:

Sinteza indocijanin boja 4-6 iz 1-3 do sintetičkog povezivanja čvrste faze na amino skupine (N-terminus ili ε-lizin) peptida

30 Sinteza slijedi preko amidiranja boja 1-3 s β-alanin-t-butilestera i "kiselog" odcjepljenja grupe t-butilestera.

Jedna otopina od 0,5 mmol boje 1-3 i 0,1 g (1,0 mmol) trietilamina u 20 ml dimetilformamida biti će na 0°C s 0,5 mmol
TBTU u 10 ml dimetilformamida pomiješano i 15 min pri 0°C miješano. Nastavno će biti jedna otopina od 0,11 g (0,6
mmol) β-alanin-t-butilester-hidroklorida i 0,6 mmol trietilamina u 5 ml dimetilformamida dokapano te će reakcijska
35 mješavina biti mješana 2 sata pri sobnoj temp. Nakon dodatka 100 ml dietiletera, istaložena čvrsta tvar će biti
otfiltrirana, u 20 ml diklormetana otopljena, sa 10 ml trifluoroctene kiseline pomiješana i pri sobnoj temp. 24 sata
miješana. Mješavina će biti u vakumu reducirana, a ostatak kao u primjeru 1 opisano, kromatografski pročišćen i
liofiliziran: iskoristivost: 0,21 g (58%) 4, 0,29 g (76%) 5, 0,28 g (72%) 6.

Primjeri 7 do 9:

Sinteza indocijanin boja 7-9 iz 1-3 do sintetičkog povezivanja čvrste faze na amino skupine (N-terminus ili ε-lizin) peptida

Priprema slijedi analogno primjerima 4-6 zu primjenu 0,1 g (0,6 mmol) glicin-t-butilester-hidroklorida, iskoristivost:
45 0,25 g (68%) 4, 0,30 g (80%) 5, 0,32 g (83%) 6.

Primjeri 10 do 12:

Sinteza indocijanin boja 10-12 iz 1-3 do sintetičkog povezivanja čvrste faze na peptide preko vezivanja na tiolne skupine cisteina

50

Sinteza slijedi preko amidiranja boja 1-3 s 3-aminopropanolom i nastavnim prevodenjem alkoholnih skupina u jedan
bromid.

Jedna otopina iz 0,5 mmol boje 1-3 i 0,1 g (1,0 mmol) trietilamina u 20 ml dimetilformamida biti će pri 0°C s 0,5 mmol
55 TBTU u 10 ml pomiješana i 15 min na 0°C miješana. Nastavno će biti jedna otopina od 850 mg (1,2 mmol)
3-aminopropanola i 1,2 mmol trietilamina u 5 ml dimetilformamida dokapano te će reakcijska mješavina biti mješana 6
sati pri sobnoj temp. Nakon dodatka 100 ml dietiletera, istaložena čvrsta tvar će biti otfiltrirana i kao u primjeru 1
opisano, kromatografski pročišćen i liofiliziran.

60 Prevodenje do bromida 10-12 slijedi miješanjem 0,3 mmol međuprodukta sa 55 mg (0,5 mmol) N-bromosukcinida i 130
mg (0,5 mmol) trifenilfosfina u mješavini od 4 ml diklormetana i 4 ml dimetilformamida za 48 sati na 4°C. Dodatkom 3
ml etera produkti se istalože, odfiltriraju i kao sirovina u povezivanju s peptidom dodaju.

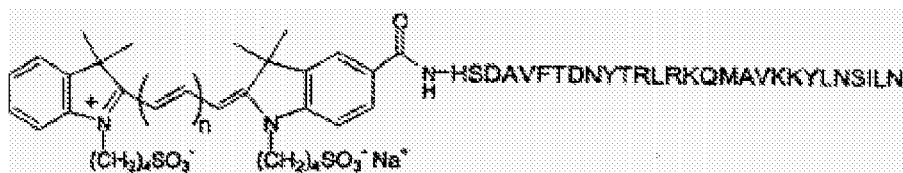
Primjeri 14-16 i 18-27:**Sinteza smole peptidnih konjugata iz VIP-receptor vezujućih peptida i boja 1-9 i 13.**

- 5 a) *Sinteza čvrste faze:* Na 50 μ mola TentaGel-Sram-smole (Rapp Polymere, Tubingen) biti će peptidi prema Fmoc-strategiji, analogno Standard-Fmoc-Maschinen-Protokoll (Pept. Res., 36 (1990) 225) zu primjenu reagensa za povezivanje PyBOP (benzotriazol-1-iloksi-tris-pirolidionofosfonij heksafluorofosfat) i N-metilmorfina, sintetiziran. Slijedeće postrane zaštitne skupine se pri tom primjenjuju: tritil za Cys, His, Asn, Gln: t-butil za Asp, Glu, Ser i Thr; t-butiloksikarbonil za Lys i Trp te pentametilkloramsulfonil za Arg.
- 10 Vezivanje na ϵ -amino skupine jednog lizina (primjer 24) biti će preko ortogonalne tehnike zaštitnih skupina postignuto. Kao gradivni element lizina biti će korišten Fmoc-Lys(Dde)-OH, a peptid kao gore opisano sintetiziran. Nakon acetiliranja N-terminusa slijedi odcjepljenje Dde-zaštitne skupine selektivno, preko 3% hidracinhidrata.
- 15 b) *Vezivanje boje:* Na peptide koji su još vezani na čvrstu fazu biti će boje na N-terminus odnosno na lizin vezane. Za to će biti 75 μ mola određene boje 1-9 i 13 (1,5 eq) u 600 μ mola dimetilformamida otopljeno i sa 83 μ mola TBTU (2-(1Hbenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronija-tetrafluorborata) kao i 150 μ mola N,N-diizopropiletilamina pomiješano. Nakon 2 minute biti će ista reakcijska mješavina na pripadajuću smolu koja može nositi peptid, dodana i ostavljena preko noći u reakciji. Zaključno će biti smola 5x sa dimetilformamidom i 3x sa diklormetanom isprana i na zraku osušena.
- 20 c) *Odcjepljenje zaštitnih skupina i odvajanje konjugata boja-peptid:* 1,5 ml mješavine koja se sastoji od 750 mg fenola, 250 μ l etanditiola, 500 μ l tioanizola i 500 μ l vode u 10 ml trifluorne octene kiseline biti će na smolu koja može nositi peptidne konjugate dodano i ostavljeno da djeluje 4 sata. Konjugati boje i peptida biti će sa hladnim t-butilmetileterom istaloženi, 6x sa hladnim dietileterom isprani, u 5% octenoj kiselini otopljeni i osušeni suhim zamrzavanjem. Analiza čistoće i pročišćavanje konjugata slijedi s pomoću RP-HPLC (reverzno fazna visokotlačna tekuća kromatografija) na jednoj Vydac-C18-koloni (gradijent: voda +0,05% TFA/acetonitril, 5% na 60% acetonnitrila u 20 min, detekcija: 214 i 750 nm.)

30 Strukture sintetiziranih konjugata boja i peptida su u slijedećem pregledu objedinjene:

Konjugati boje sa VIP-receptor-vezujućim peptidom I**Primjer 14 do 16:**

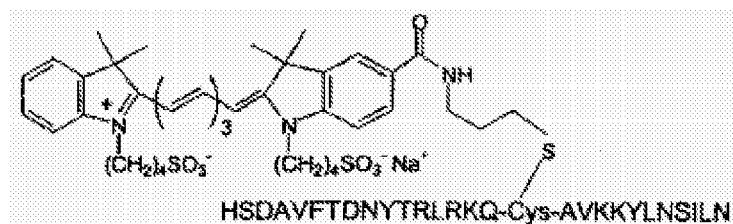
35 konjugati boje 1-3 sa VIP (1-28)



- 40 n = 1: indokarbocijanin-VIP(1-28)-konjugat 14
 n = 2: indodikarbocijanin-VIP(1-28)-konjugat 15
 n = 3: indotrikarbocijanin-VIP(1-28)-konjugat 16

Primjer 17:

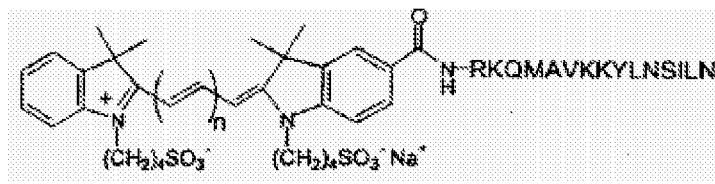
45 Konjugat boje 12 sa Cys¹⁷-VIP(1-28)



Indotrikarbocijanin-Cys¹⁷-VIP(1-28)-konjugat 17

Primjer 18 do 20:

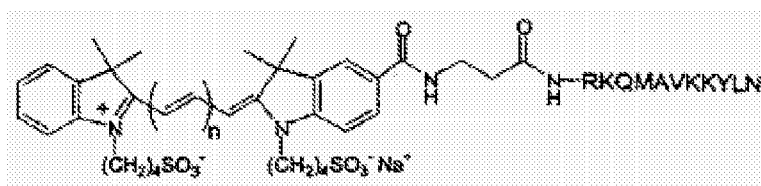
Konjugati boje 1-3 sa VIP(14-28)



- n = 1: indokarbocijanin-VIP(14-28)-konjugat **18**
 n = 2: indodikarbocijanin-VIP(14-28)-konjugat **19**
 n = 3: indotrikarbocijanin-VIP(14-28)-konjugat **20**

Primjer 21 do 23:

Konjugati boje 4-6 sa VIP(14-24)

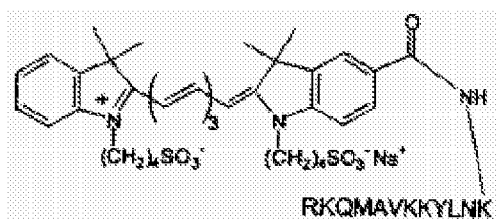


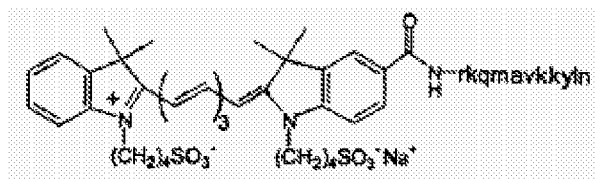
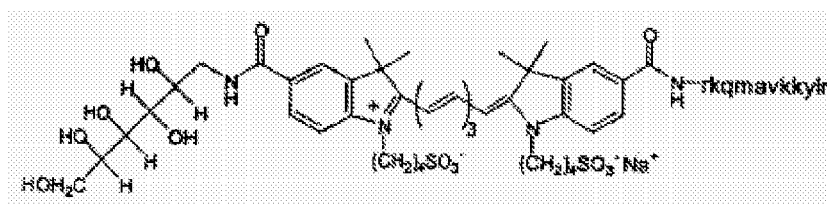
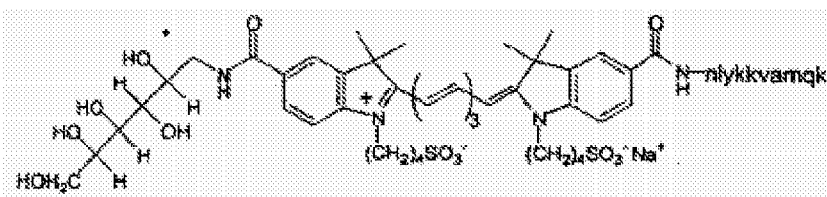
- n = 1: indokarbocijanin-β-alanin-VIP(14-28)-konjugat **21**
 n = 2: indodikarbocijanin-β-alanin-VIP(14-28)-konjugat **22**
 n = 3: indotrikarbocijanin-β-alanin-VIP(14-28)-konjugat **23**

Primjer 17:**Sinteza smole peptidnih konjugata koji se sastoje od VIP-receptor vezujućih peptida i boja 10-12.**

Da bi se boje 10-12, koje nose brom, kemoselektivno preko tioeterne veze vezale na peptid, mora u peptid jedan cistein ili homocistein sa ortogonalnom zaštitnom skupinom biti ugrađen. Sinteza čvrste faze peptida biti će kao u primjerima 14-16/18-27 opisano, provedena i gradivi element Fmoc-cys(Mmt)-OH primješan. Monometoksitritil skupina (Mmt) je zu dobitak uvriježenih postranih zaštitnih skupina, preko 1% TFA/5% triizobutilsilan u diklormetan, moguće odcijepiti. Za to će smola 3x sa po 1 ml gornje otopine, 10 min, biti inkubirana. Nakon ispiranja smole sa diklormetanom (3x), DMF (5x) i etanol (3x) biti će smola 2 min s jednom 20%-om otopinom cezijkarbonata (1 ml) inkubirana i zaključno sa vodom (2x), etanolom (2x) i DMF-om (2x) isprana. Zaključno će biti 75 μmola određene boje 10-12 (1,5 eq) u 600 μl dimetilformamida otopljeno i na određenu smolu dodano, a postupak će biti ponovljen nakon 30 min. Zaključno će smola 5x sa dimetilformamidom te sa diklormetanom (2x) isprana. Nakon sušenja smole na zraku, slijedi odcjepljivanje zaštitnih skupina i odvajanje od "nosača", kao što je gore opisano.

Strukture daljnjih sintetiziranih konjugata peptida i boja su u slijedećem pregledu sažete:

Konjugati boja sa VIP-receptor-vezujućim peptidima II**Primjer 24:**Konjugat boje 6 sa Lys²⁵-VIP(14-25)(ε-amino-indotrikarbocijanin)-Lys²⁵-VIP(14-25)-konjugat **24**

Primjer 25:Konjugat boje **3** sa D-VIP(14-24)Indotrikarbocijanin-D-VIP(14-24)-konjugat **25****Primjer 26:**Konjugat boje **13** sa D-VIP(14-24)Indotrikarbocijanin-5-glukamid karbonske kiseline-D-VIP(14-24)-konjugat **26****Primjer 27:**Konjugat boje **13** sa retro-D-VIP(14-24)Indotrikarbocijanin-5-glukamid karbonske kiseline-retro-D-VIP(14-24)-konjugat **27****Primjer 28 do 32:****Sinteza smole konjugata peptida koja se sastoji od somatostatinvezujućih peptida i boja 1-9 i 13****Opće odredbe:**

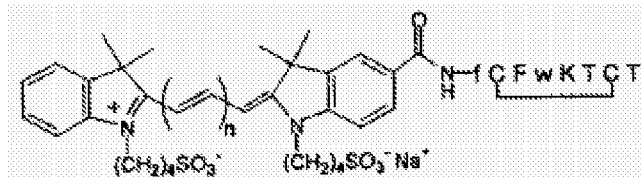
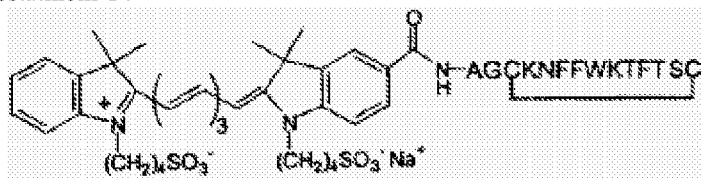
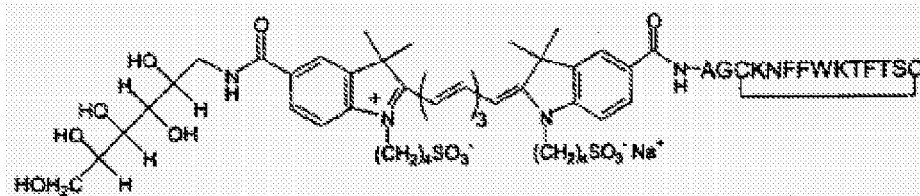
Sinteza će biti provedena na 500 mg TCP-Thr(But)-fmoc-smole (firma Pepchem Tubingen) sa jednim dopunjavanjem (specifičnim skupinama) od 0,49 mmol/g. Peptid će biti "korak po korak" za primjenu slijedećih temporarnih zaštitnih skupina sintetiziran: terc.-butil za Thr i Ser, tritil za Cys i Asp, Boc za trp i Lys. Kao reagens za kondenzaciju biti će korišten HBTU.

Nakon odcjepljenja N-terminusa Fmoc-zaštitne skupine boja **1-9, 13** će biti u jednom posebnom koraku sinteze kondenzirana. Za to će biti 255 mg smole u ca. 2 ml DMF suspendirano i sa 0,5 mmol boje, 0,5 mmol HBTU i 0,17 ml DIEA pomiješano. Smjesa će biti narednih 18 sati na sobnoj temp. miješana, smola će nakon toga biti odstranjena, ostatak sa diklormetanom ispran i osušen. Odcjepljenje konjugata boja-peptid od smole slijedi sa 95% trikloroocetnom kiselinom, za dodatak triizopropilsilana i nastavnim liofiliziranjem iz 10% octene kiseline. Sirovi proizvod biti će pomoću aktivnog ugljena cikliziran i kromatografski pročišćen (50x300 mm VYDAC RP-18, gradijent: voda/acetonitril).

Strukture sintetiziranih konjugata boja-peptid su u slijedećem pregledu sažete:

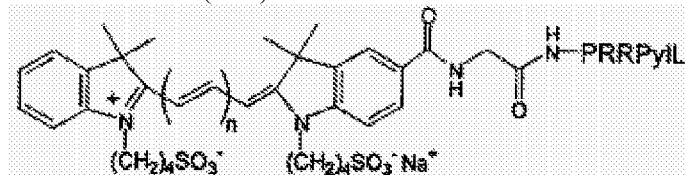
Konjugati boja sa somatostatin vezujućim peptidima**Primjeri 28 do 30:**

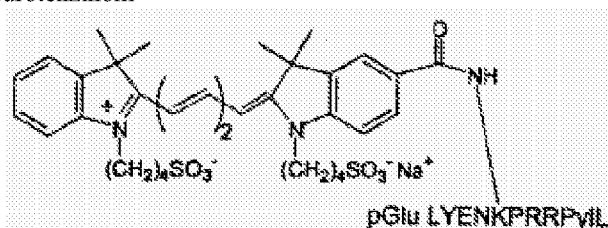
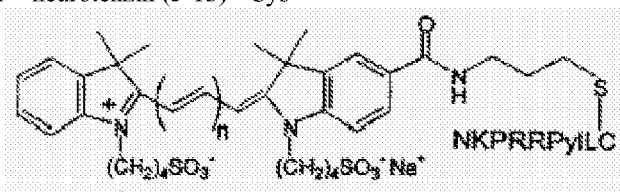
Konjugat boje 1-3 sa pentetreotidom

n = 1: Indokarbocijanin-pentetreotid **28**n = 2: Indodikarbocijanin-pentetreotid **29**n = 3: Indotrikarbocijanin-pentetreotid **30****Primjer 31:**Konjugat boje **3** sa somatostatinom-14Indotrikarbocijanin-somatostatin-14-konjugat **31****Primjer 32:**Konjugat boje **13** sa somatostatinom-14Indotrikarbocijanin-5-glutamid karbonske kiseline-somatostatin-14-konjugat **32****Primjeri 33 do 38:****Sinteza konjugata peptida iz neurotenzin-peptida i boje 3**

Sinteza supstanci slijedi analogno kao što je opisano za primjere 14-27, opći protokol.

Strukture sintetiziranih konjugata peptida i boja su u slijedećem pregledu sažete:

Konjugati boja sa neurotenzin vezujućim peptidima**Primjeri 33 do 35:**Konjugat boja **7-9** sa D-Tyr¹¹-neurotenzinom (7-13)n = 1: Indokarbocijanin-D-Tyr¹¹-neurotenzin (7-13)-konjugat **33**n = 2: Indodikarbocijanin-D-Tyr¹¹-neurotenzin (7-13)-konjugat **34**n = 3: Indotrikarbocijanin-D-Tyr¹¹-neurotenzin (7-13)-konjugat **35**

Primjer 36:Konjugat boje 2 sa D-Tyr¹¹-neurotenzinom(ε-amino-Lys⁶-indodi-karbocijanin)-D-Tyr¹¹-neurotenzin-konjugat 36**Primjer 37 do 38:**Konjugat boje 10-11 sa D-Tyr¹¹-neurotenzin (5-13) - Cysn = 1: Indokarbocijanin-D-Tyr¹¹-neurotenzin (5-13)-Cys-konjugat 37n = 2: Indodikarbocijanin-D-Tyr¹¹-neurotenzin (5-13)-Cys-konjugat 38**Primjer 39:****Svojstva apsorpcije i fluorescencije sintetiziranih konjugata boja i peptida**

- 15 Apsorpcijski maksimumi i koeficijenti specifičnih valnih dužina karakterističnih za navedene spojeve (Extinktionskoeffizient) bili su određivani u PBS-i i plazmi goveda (uređaj Perkin Elmer Lambda 2). Fluorescencijski emisijski spektar bio je nakon poticaja na kratkovalnoj strani (ca. 40 nm od apsorpcijskog maksimuma) dobiven (SPEX Fluorolog, R928 PMT)
- 20 Apsorpcijski i podaci o fluorescenciji su u tabeli 4 objedinjeni. U tabeli 5 su tipični apsorpcijski i fluorescentno-emisijski spektri na primjerima pokazani.

Primjer 40:**Utvrđivanje snimaka stanice pomoću fluorescentne mikroskopije**

- 25 Vezivanje i preuzimanje (apsorpcija u tkiva) izumom predloženih spojeva bili su in vitro na humanim tumorskim stanicama ispitivani, koje receptore za vazoaktivni intestinalni peptid i/ili somatostatin i/ili neurotenzin eksprimiraju.
- 30 Za to je 5×10^5 tumorskih stanica u 1,5 ml medija inkubirano, koji sadrži test supstance. Za to su različite koncentracije test supstanci (10 nM - 10 μM) korištene, vrijeme inkubacije je varirano (1 min – 24 sata). Nakon inkubacije, stanice su bile fiksirane i pripremljeni mikroskopski preparati. Pregled je uslijedio na jednom Axiovert 135-fluorescentnom mikroskopu, koji je bio opremljen sa jednim Cy 7-(Exciter HQ 710/70nm, Emitter 810/90nm, Beamsplitter (razpršivač snopa zraka) 750nm LP), Cy5 -(Exciter 575-625 nm, Emitter 660-710nm BP, Beamsplitter (razpršivač snopa zraka) 645nm) i Cy3- skupinom filtera (Exciter 546/12 nm, Emitter 590 nm LP, Beamsplitter (razpršivač snopa zraka) 580 nm). Od svih preparata bile su snimljene fotografije pomoću bijelog izvora svjetla i fluorescencije, s pomoću jedne CCD-kamere (Visitron RTE/CCD – 576), i digitalno pohranjene.

Izdvojeni rezultati su u slijedećem opisani:

- 40 Napravljene su mikroskopske snimke sa bijelim svjetlom i fluorescentnim izvorom (Cy7-filtiri) stanica HT29, nakon 30 minutne inkubacije s 10 μM Indotrikarbocijanin-VIP(1-28)-konjugatom 16. Na "fluorescentnim" snimkama su nadalje homogena, preko stanica raspodjeljena fluorescencija detektirana. Dodatno su vidljivi areali s povećanim intenzitetom signala, koji mogu asociirati sa vezikularnim kompartmentima. Stanice na "fluorescentnim" snimkama koreliraju po svom prostornom rasporedu sa onima snimljenim s pomoću izvora bijele svjetlosti.
- 45 Sa slijedećim spojevima su "bije" i "fluorescentne" snimke (Cy7-filtiri) u analognom slijedu dobivene: Indotrikarbocijanin-VIP(14-28)-konjugat 20, 10 μM, HT29-stanice. Homogeno preko stanica rasprostranjena fluorescencija, dobra korelacija sa "bijelim"-slikama. Indotrikarbocijanin-retro-D-VIP(24-14) 25, 10 μM, HT29-stanice. Homogeno preko stanica rasprostranjena fluorescencija, dobra korelacija sa "bijelim"-slikama.

Indotrikarbocijanin-pentetreotid-konjugat 30, 10 μ M, RIN38-VIP1-stanice. Fluorescentni areali sa vezikularnim uzorkom u području stanične membrane, dobra korelacija sa "bijelim"-slikama.

Nadalje su fluorescentni snimci u analognoj izvedbi sa slijedećim spojevima dobiveni:

- 5 (Amino-indotrikarbocijanin-Lys²⁵-VIP(14-25)-konjugat 24, 10 μ M, RIN38-VIP1-stanica, Cy⁷-filteri. Fluorescentna slika pokazuje jednu homogenu, intracelularnu fluorescenciju, u blizini stanične jezgre.

Indokarbocijanin-VIP(1-28)-konjugat 15, 10 μ M, RIN38-VIP1-stanica, Cy⁵-filteri. Fluorescentna slika pokazuje intracelularne fluorescentne areale sa vezikularnim uzorkom u području stanične membrane.

10

Indokarbocijanin-VIP(1-28)-konjugat 14, 10 μ M, RIN38-VIP1-stanica, Cy³-filteri. Fluorescentna slika pokazuje intracelularne fluorescentne areale sa vezikularnim uzorkom u području stanične membrane.

Primjer 41:

- 15 **Ispitivanje akumuliranja tumora pomoću in-vivo-fluorescentnih fotografija na miševima oboljelim od tumora**

Svojstva koja daju sliku o izumom predloženim spojevima bila su ispitana in-vivo, nakon injekcije miševima (bez dlake), nositeljima tumora. Za to je 0,1 μ mol/kg do 2 μ mol/kg supstance intravenozno aplicirano, te je nakupljanje u području tumora u vremenskom intervalu od 0 do 48 sati praćeno. Fluorescencija supstance bila je preko ozračivanja životinja s blizim infracrvenim svjetlom valne dužine 640 nm (indodikarbocijanini), odnosno 740 nm (indotrikarbocijanini), koje je s pomoću jednog Nd:YAG lasera proizvedeno, izazvana. Fluorescentno isijavanje je kod valne dužine od >700 nm, odnosno >800 nm, preko jedne intenzivirane CCD-kamere, detektirano, a fluorescentne snimke su digitalno pohranjene.

20

Izdvojene rezultati su u slijedećem opisani:

25

Od jednog "golog" miša, nositelja tumorskog oboljenja (HT29-tumor u desnoj zadnjoj slabini) bile su fluorescentne snimke cijelog tijela prije i 1 sat nakon aplikacije 0,1 μ mol/kg indotrikarbocijanin-VIP(14-28)-konjugata 20, snimljene. Intenzitet fluorescencije prije aplikacije je zanemariv (slaba autofluorescencija). 1 sat nakon aplikacije rezultiralo je jednim 2-strukim intenzitetom signala u tumoru, relativno prema kontralateralnoj slabini, kod inače homogene preko ostatka tijela zaspodjeljene fluorescentne emisije.

30

Od jednog miša nositelja tumorskog oboljenja (RIN38-SSTR2-tumor u desnoj stražnjoj slabini) bile su fluorescentne snimke cijelog tijela prije i 1 sat nakon aplikacije 0,1 μ mol/kg indotrikarbocijanin-pentetreotid-konjugata 30, snimljene. Intenzitet fluorescencije prije aplikacije je zanemariv (slaba autofluorescencija). 1 sat nakon aplikacije rezultiralo je jednim 3-strukim intenzitetom signala u tumoru, relativno prema kontralateralnoj slabini, kod inače homogene preko ostatka tijela zaspodjeljene fluorescentne emisije.

35

Od jednog miša nositelja tumorskog oboljenja (HT29-tumor u desnoj stražnjoj slabini) bile su fluorescentne snimke cijelog tijela prije i 1 sat nakon aplikacije 0,1 μ mol/kg (ϵ -amino-indotrikarbocijanin)-Lys²⁵-VIP(14-25)-konjugata 25, snimljene. Intenzitet fluorescencije prije aplikacije je zanemariv (slaba autofluorescencija). 1 sat nakon aplikacije rezultiralo je jednim 1,5-strukim intenzitetom signala u tumoru, relativno prema kontralateralnoj slabini. Dodatno je jedan povišeni fluorescentni signal u bubrezima detektiran.

40

Od jednog miša nositelja tumorskog oboljenja (HT29-tumor u desnoj stražnjoj slabini) bile su fluorescentne snimke cijelog tijela prije i 5 min nakon aplikacije 0,2 μ mol/kg indodikarbocijanin-VIP(1-28)-konjugata 15, snimljene. Intenzitet fluorescencije prije aplikacije je zanemariv (slaba autofluorescencija). 1 sat nakon aplikacije rezultiralo je jednim 1,4-strukim intenzitetom signala u tumoru, prema kontralateralnoj slabini. Dodatno je jedan povišeni fluorescentni signal u bubrezima detektiran.

45

Primjer 42:

Istraživanje stabilnosti konjugata peptida i boja u plazmi goveda

Kemijska stabilnost izumom predloženih spojeva u plazmi bio je in vitro, u ovisnosti o vremenu, pomoću HPLC, ispitivan. Za ti je bilo 1mM otopine peptida u PBS-u u plazmi goveda (firma Graeber, zamrznuta, za analizu heparina), koncentracije 30 μ M pipetirano, a otopina je pri 37°C inkubirana.

55

U različitim vremenskim intervalima (0,5; 1; 2; 4; 6; 24 sata) uslijedila je prerada proba, pri kojoj je 1 ml otopine plazme pomiješan sa 1 ml MeOH, a istaložene bjelancevine su bile otcentrifugirane.

Analiza preostalog tekućeg dijela uslijedila je pomoću HPLC-a, preko određivanja količine pri 750 nm, koji se odnosi na sadržaj nakon 1 minute inkubacije pri 0°C (kontrolna proba).

60

HPLC: Beckmann, diodno "array"-detektor TIDAS (firma J&M) 350-1000 nm;

Kolona: Chromasil 5 μ , 250 mm x 4,5 mm

Eluent: A: 90% H₂O(+0,5 % TFA) / 10% MeOH

B: 10% H₂O(+0,5 % TFA) / 90% MeOH

5 Gradijent: 10% B do 100% B u vremenu od 20 min

Primjeri su u tabeli 6 sažeti.

Primjer 43:

10 Supstitucijska analiza VIP-a pomiću "spot"-sinteze

1. Sinteza peptida na celulozi

15 Sinteza peptida na celulozi (spot-sinteza) bila je najprije 1988. Od R. Franka i R. Doringa objavljena, a 1992. Detaljno od R. Franka opisana. Ovdje je bila u AG Schneider-Mergener etablišana metoda, upotrijebljena.

20 Celulozna membrana bila je kemijski modificirana, da bi prikladne funkcije ankera za slijedeću sintezu peptida bila pripremljena. Pri tom je na jednu amino-funkcionaliziranu celuloznu membranu (CAPE-membran) jedna merkaptio-funkcija uvedena. Na tu merkaptiofunkciju mogla se prva aminokiselina u obliku jednog brompropilestera nadovezati. Nastavno su sve aminokiseline peptida sukcesivno prema Fmoc-strategiji nadograđene. Na kraju je indodikarbojanin-boja N-terminusa na peptid vezana i nastavno su sve postrane zaštitne skupine bile odcijepljene.

25 Da bi se peptidi mogli testirati kao receptorni spojevi, peptid je morao biti odcijepljen od celuloze. Za to je razvijena jedna metoda, kod koje je prvi puta uspjelo, peptide sa autentičnim C-terminusom od celuloze odcijepiti.

1a. Modifikacija celulozne membrane

30 Jedna 20x30 cm velika celulozna membrana (Whatman 50) bila je na 2 min. s metanolom/1,2 % perkloroetenom kiselinom inkubirana i nastavno osušena.

Nakon 3-satne inkubacije sa 10% epibromhidrinom u dioxanu/1,2% perklornoj kiselini ostavljena je 30 min. u reakciji sa metanolom, a nakon toga je 2x isprana metanolom.

35 Nastavno je 3x sa dimetilformamidom (DMF) isprana i preko noći sa 50% 1,3-dijaminopropanom (v/v) u DMF-u inkubirana. Nakon toga je na slijedeći način isprana: 3xDMF, 2x etanol, 2x aqua dest., 2x etanol 15 min sa 5M natrijmetanolat, 3x matanolom, 4x aqua dest., 3x etanol, 1x dietileter.

1b. Definicija "spots"-a

40 Za definiranje spotsa bilo je 1,3 μ l 0,6 M Fmoc- β -alanin-Opfp-otopine sa auto-spot robotom 222 XL (Abimed, Langenfeld) pri reakcijskom vremenu od 15 min na određene točke celulozne membrane dvostruko pipetirano. Membrana je 2 minute sa 2% acetanhidrid otopinom i 30 min sa 20% acetanhidridom/10% diizopropiletilaminom acetilirana.

45 Za razdvajanje Fmoc-zaštitnih skupina bila je zatim membrana 3x sa DMF-om isprana, 2x 10 min. sa 20% piperidin otopinom inkubirana, 5x sa DMF-om i 1x sa etanolom isprana. Slobodne aminoskupine mogle su s pomoću bromfenoli plavetnilom biti vidljive. Nakon ponovljenog pranja sa etanolom, membrana je bila osušena.

1c. Vezivanje Mmt-merkaptopropionske kiseline i brompropil estera

50 0,6 M merkaptopropionske kiseline bilo je u reakcijskom vremenu od 15 min. dvostruko na definirani spot pipetirano. Nastavno je bila 3x sa DMF-om i 3x sa diklormetanom (DCM) isprana.

55 Odcjepljenje Mmt-zaštitnih skupina uslijedilo je inkubacijom od 2 min. sa 10% dikloroetenom kiselinom/0,5 % trifluoroetenom kiselinom i 3x5 min. sa 10% dikloroetenom kiselinom/0,5 % trifluoroetenom kiselinom/ 5% triizobutilsilan. Slijedeći koraci ispiranja bili su provedeni:

1x DCM, 2x etanol, 1x aqua dest., 1-2 min. sa 10% cezijkarbonata, 1x aqua dest., 2x etanol, 1x dietileter.

60 Određeni Fmoc-brompropil-estri amino kiseline bili su 3x, pri koncentraciji od 0,6 M i reakcijskom vremenu od 15 min. povezani. Odcjepljenje Fmoc-zaštitnih skupina bilo je u 1b provedeno.

1d. Povezivanje aminokiselina

Peptidi su preko ponavljanih pipetiranja od 0,6 M otopine aminokiselina u N-metilpirolidonu na spotove i zaključnog odcjepljenja Fmoc-zaštitnih skupina, izgrađeni.

1e. Povezivanje indodikarbocijanin boje

Jedna otopina od 0,3 M indodikarbocijanin boja sa 0,3 M TBTU i 0,6 M diizopropiletilamina bila je aktivirana i 4x pri jednom reakcijskom vremenu od 15 min na spotove pipetirana.

1f. Odcjepljenje postranih zaštitnih skupina

Odcjepljenje postranih zaštitnih skupina slijedi preko tretmana membrane u pravilnim slijedovima sa 90% trifluor octenom kiselinom/3% triizobutilsilanom/2% aqua. dest./1% fenol od 30 min te sa 50% trifluor octenom kiselinom/3% triizobutilsilanom/2% aqua.dest./1% fenola za 2,5 sati. Nastavno je 4x sa diklormetanom, 3x sa DMF-om i 1x sa etanolom isprano.

2. Odcjepljenje peptida od celulozne membrane

Spotovi su bili izbušeni te s metanolom isprani. Za odcjepljenje bilo je 30 min, sa 70 mM natrijmetanolatom u metanolu inkubirano. PH je bio dodatkom 37% solne kiseline korigiran. Nastavno su peptidi u jednoj Speed-Vac (liofilizator) osušeni.

Nakon sušenja peptidi su otopljeni u aqua dest. te pomoću RP-HPLC i MALDI-TOF analizirani.

3. Stanični assay i protočna citometrija

Koncentracija VIP-derivata bila je fotometrijski preko boje očitavana. U staničnom assay-u peptidi su bili upotrebljeni u konc. od 150 mM. Pri tom je bilo 1×10^5 RIN38(VAC1)-stanica sa VIP-derivatima jedan sat, pri 37°C u veznom puferu (50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 5mM MgCl₂, 1mM CaCl₂, 100 mM NaCl, 4% BSA) inkubirano.

Nastavno su stanice bile 2x sa PBS-om ispirane, u FACS-reagencijske posudice prenesene te 5 min. na 377 g centrifugirane. Stanični talog bio je u 300 µl staničnog fiksirnog sredstva resuspendiran, na FACS-Calibur (Bacton Dickinson) sa FL4-Optik izmjeren.

4. Analiza rezultata

Intenzitet fluorescencije u protočnoj citometriji mjeren nativno, prirodno dolazeći, humanih VIP-peptida bio je 100% korišten. Standardna odstupanja od 28 nativnih VIP-peptida iznosila su 11%. Daljnji VIP-peptidi bili su s takvim 100% ujednačeni.

Prikaz 7 pokazuje relativni intenzitet fluorescencije od RIN38 VPAC1-stanica nakon inkubacije u prisutnosti 150 nM peptida markiranih bojama za 1 sat, pri 37°C. Podaci u postocima, odnose se na nativni peptid određenog reda.

Literatura za spot-sintezu:

1. Frank, R. (1992) Spot synthesis: an easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support. *Tetrahedron* 48, 9217-9232
2. Kramer, A., Schneider-Mergener, J. (1998) Synthesis and screening of peptide libraries on continuous cellulose membrane supports. *Methods in Molecular Biology* 87, 25-39
3. Volkmer-Engert, R., Hoffmann, B., Schneider-Mergener, J. (1997) *Tetrahedron Lett.* 38, 1029-1032
4. Licha, K., Bhargava, S., Rheinländer, C., Becker, A., Schneider-Mergener, J., Volkmer-Engert, R. (in press) Highly parallel Nano-synthesis of cleavable peptide-dye conjugates on cellulose membranes. *Tetrahedron Lett.*

Primjer 44

a) 5-N-(2,3-dihidroksipropil)aminokarbonil-1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimetil (3H) indolenin

0,9 g (2,6 mmol) 5-carboksi-1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimetil (3H) indolenin (Anal. Biochem. 217, 197, 1994) biti će u 30 ml apsolutnog N,N-dimetilformamida i 3 ml piridin položen i sa 1,35 g (5,3 mmol) disukcinimidilkarbonata pomiješano. Nakon 3 sata doda se 0,965 g (10,6 mmol) 2,3-dihidroksipropilamina. Sve se izmiješa pri sobnoj temp., mješavina se otpari do suhog, a ostatak se pomiješa sa dietileterom. Čvrsta tvar će biti odisana, a pročišćavanje će biti izvršen na RP-materijalu, kromatografski.

Iskoristivost: 0,82 g (76% d. Th.)

Analiza (odnosi se na supstance slobodne od otapala):

ber.:	C 55,32	H 6,84	N 6,79	S 7,77	O 23,27
gef.:	C 55,39	H 6,85	N 6,57	S 7,88	

b) 4-[2-[4-klor-7-[5-N-(dihidroksipropil)aminokarbonil-3,3-dimetil-1-(4-sulfonatobutil)indolin-2-yliden]-3,5-(propan-1,3-diil)-1,3,5-heptatrien-1-il]-5-N-(dihidroksipropil)aminokarbonil-3,3-dimetil(3H)indolio]butansulfonat, natrijeva sol

Jedna otopina od 360 mg (1 mmol) N-[5-anilino-3-klor-2,4-(propan-1,3-diil) 2,4-pentadien-1-yliden]anilinum-klorid, 825 mg (2 mmol) 5-N-(2,3-dihidroksipropil) aminokarbonil -1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimetil(3H)indolennin (primjer 44a) i 330 mg (4 mmol) suhog natrij acetata u 30 ml etanola biti će 2 sata, pod argonom, na povratnom toku, kuhano. Nastavno, oddestilirira se etanol, a ostatak se pročisti kromatografski.

Iskoristivost: 0,58 g (59% d. Th.)

Analiza (odnosi se na supstance slobodne od otapala):

ber.:	C 56,17	H 6,15	N 6,23	S 7,77	O 23,27	Na 2,26
gef.:	C 55,99	H 6,39	N 6,87	S 7,64		Na 2,17

c) 4-[2-[4-(4-(2-karboksietil)feniloksi)-7-[5-N-(dihidroksipropil)aminokarbonil-3,3-dimetil-1-(4-sulfonatobutil)indolin-2-yliden]-3,5-(propan-1,3-diil)-1,3,5-heptatrien-1-il]-5-N-(dihidroksipropil)aminokarbonil-3,3-dimetil(3H)indolio]butansulfonat, natrijeva sol, N-hidroksisukcinimidester

225 mg (1,4 mmol) 3-(4-hidroksifenil)propionske kiseline bilo je u 10 ml suhog N,N-dimetilformamida, pod zaštitnim plinom, otopljeno te sa 65 mg (2,7 mmol) natrij hidrida (60% u ulju) pomiješano. Nakon 30 min. dodano je 138 mg (0,14 mmol) 4-[2-[4-klor-7-[5-N-(dihidroksipropil) aminokarbonil-3,3-dimetil-1-(4-sulfonatobutil) indolin-2-yliden]-3,5-(propan-1,3-diil)-1,3,5-heptatrien-1 il]-5-N (dihidroksipropil) aminokarbonil -3,3-dimetil (3H) indolio] butansulfonata, natrijeva sol (primjer 44b) te se miješa narednih 30 min. Nastavno se reakcijska mješavina pomiješa sa suhim ledom te do suhog otpari. Ostatak se pročisti preko jedne preparativne HPLC. Za spravljanje aktivnog estera otopi se 14 mg (120 μmol) N-hidroksisukcinimida i 2 mg (2,4 μmol) karbonske kiseline u 200 μl N,N-dimetilformamida. Nakon 10 min. doda se 24 mg (120 μmol) dicikloheksilkarbodiimida i miješa preko noći pri sobnoj temp. Aktivni ester će biti nadalje bez dodatne obrade u slijedećem stupnju korišten.

Analogno sintezi prema primjeru 14-16 i 18-27a (sinteza čvrste faze peptida) biti će VIP-analog HSDAVFWDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN na čvrstu fazu sintetiziran. Boja 4-[2-[4-(4-(2-karboksietil)feniloksi)-7-[5-N-(dihidroksipropil)aminokarbonil-3,3-dimetil-1-(4-sulfonatobutil)indolin-2-yliden]-3,5-(propan-1,3-diil)-1,3,5-heptatrien-1il]-5-N (dihidroksipropil) aminokarbonil -3,3-dimetil (3H) indolio] butansulfonat, natrijeva sol, biti će prema primjeru 14-16 i 18-27 b (povezivanje boja) na peptid povezano i prema primjeru 14-16 i 18-27 c (odcepljenje zaštitnih skupina i odvajanje konjugata peptid-boja) taj konjugat izoliran i pročišćen.

d) 4-[2-[4-(4-(2-izotiocijanatoetil)feniloksi)-7-[5-N-(dihidroksipropil)aminokarbonil-3,3-dimetil-1-(4-sulfonatobutil)indolin-2-yliden]-3,5-(propan-1,3-diil)-1,3,5-heptatrien-1-il]-5-N-(dihidroksipropil)aminokarbonil-3,3-dimetil(3H)indolio]butansulfonat, natrijeva sol

Suspenciji od 28 mg (0,6 mmol) natrij hidrida (60%-ni u ulju) u 4 ml suhog N,N-dimetilformamida doda se, pri 0°C, 116 mg (0,6 mmol) 4-[2-[4-klor-7-[5-N-(dihidroksipropil) aminokarbonil -3,3- dimetil -1-(4-sulfonatobutil) indolin-2-yliden]-3,5-(propan-1,3-diil) -1,3,5 - heptatrien-1 il]-5-N (dihidroksipropil) aminokarbonil -3,3-dimetil (3H) indolio] butansulfonata, natrijeva sol (primjer 44b). Smjesa se miješa preko noći, pri sobnoj temp. i pomiješa nastavno sa suhim ledom. Na rotacionom otparivaču se otpari do suhog i ostatak pročisti preparativno na HPLC-u.

Iskoristivost: 85 mg (54% d. Th.)

Analiza (odnosi se na supstance slobodne od otapala):

ber.:	C 58,65	H 6,09	N 6,22	S 8,54	O 18,87	Na 2,04
gef.:	C 58,53	H 6,17	N 6,11	S 8,63		Na 1,83

Analogno sintezi prema primjeru 14-16 i 18-27a (sinteza čvrste faze peptida) biti će VIP-analog HSDAVFTDNY TRLRFQMAVK KYLNSILN na čvrstu fazu sintetiziran. Boja 4-[2-[4-(4-(2-izotiocijanatoetil)feniloksi)-7-[5-N

-(dihidroksipropil) aminokarbonil -3,3- dimetil-1-(4-sulfonatobutil)indolin-2-yliden]-3,5-(propan-1,3-diil)-1,3,5-heptatrien-1-il]-5-N (dihidroksipropil) aminokarbonil -3,3-dimetil (3H) indolio] butansulfonat, natrijeva sol, biti će na peptidni N-terminus pripojena prema primjeru 14-16 i 18-27 b (povezivanje boja) na peptid povezano i prema primjeru 14-16 i 18-27 c (odejpljenje zaštitnih skupina i odvajanje konjugata peptid-boja) taj konjugat izoliran i pročišćen.

Na analogan način mogu daljnje sintetičke hidrofilne boje iz slijedećih gradivnih elemenata biti izgrađeni:

Hidrofilni indolenin-derivati sa hidroksialkilnim supstituentima: (spravljeno prema primjeru 44a)

- 5-N-(2,3-dihidroksipropil)-N-metilaminokarbonil-1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimetil (3H) indolenin
- 5-N-(dihidroksietil)-aminokarbonil-1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimetil (3H) indolenin
- 5-N-(2,3-dihidroksipropil)-N-(hidroksietil)-aminokarbonil-1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimetil (3H) indolenin
- 5-N,N-(bi-dihidroksietil)-aminokarbonil-1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimetil(3H) indolenin
- 5-N-(2,3,4,5,6-pentahidroksiheksil)-aminokarbonil-1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimetil(3H)indolenin
- 5-N-(1,3,4-trihidroksibutil-2-il)-N-metilaminokarbonil-1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimetil(3H)indolenin

Primjer 45

A) 5-N-(2,3,4,5,6-pentahidroksiheksil)-aminokarbonil-1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimetil(3H)indolenin

0,6 g (1,8 mmol) 5-karboksi-1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimetil(3H)indolenin (Anal. Biochem. 217, 197, 1994) biti će u 20 ml apsolutnog N,N-dimetilformamid i 2 ml piridin stavljeno i sa 0,95 g (3,6 mmol) disukcinimidilkarbonata pomiješano. Nakon 2 sata doda se 1,4 ml(10 mmol) trietilamina i 322 mg (1,8 mmol) glukamina. Sve se miješa preko noći, pri sobnoj temp., otpari do suhog, a ostatak pomiješa sa dietileterom. Čvrsta tvar se odsiše te se pročisti na RP-materijalu, kromatografski.

Iskoristivost: 0,67 g (74% d.Th.).

Analiza (odnosi se na supstance bez otapala):

ber. : C 52,58	H 5,82	N 5,57	S 6,38	O 28,65
gef. : C 52,47	H 6,31	N 5,39	S 6,44	

B) 4-[2-[4-klor-7-[5-N-(2,3,4,5,6-pentahidroksiheksil)aminokarbonil-3,3-dimetil-1-(4sulfonatobutil)indolin-2-iliden]-3,5-(propan-1,3-diil)-1,3,5-heptatrien-1-il]-3,3-dimetil5-[N-(2,3,4,5,6-pentahidroksiheksil)-aminokarbonil](3H) indolio]butansulfonat, natrijeva sol

Otopina od 180 mg (0,5 mmol) N-[5-anilino-3-klor-2,4(propan-1,3-diil)-2,4-pentadien-1-iliden]anilin-klorid, 503 mg (1 mmol) 5-N-(2,3,4,5,6-pentahidroksiheksil)-aminokarbonil-1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimetil(3H)indolenin (primjer 45a) i 165 mg (2 mmol) suhog natrijacetata u 10 ml etanola biti će 2 sata, pod argonom na povratnom hladilu kuhano. Nastavno se oddestilira etanol i pročisti ostatak kromatografski.

Iskoristivost: 0,31 g (53% d.Th.)

Analiza (odnosi se na supstancu bez otapala):

ber. : C 54,05	H 6,33	Cl 3,91	N 4,76	S 5,44	O 24,45	Na 1,95
gef. : C 53,83	H 6,20	Cl 2,87	N 4,83	S 5,29		Na 1,72

C) 4-[2-[4-(4-izotiocijanatotiofeniloksi)-7-[5-N-(2,3,4,5,6-pentahidroksiheksil)aminokarbonil-3,3-dimetil-1-(4-sulfonatobutil)indolin-2-iliden]-3,5-(propan-1,3-diil)-1,3,5-heptatrien-1-il]-3,3-dimetil5-[N-(2,3,4,5,6-pentahidroksiheksil)-aminokarbonil](3H)indolio]butansulfonat, natrijeva sol

54 mg (0,4 mmol) 4-aminotiofenola biti će u 10 ml apsolutnog N,N-dimetilformamida pod atmosferom zasićenom argonom, otopljeno i pri sobnoj temperaturi sa 165 mg (0,14 mmol) 4-[2-[4-klor-7-[5-N-(2,3,4,5,6-pentahidroksiheksil)aminokarbonil-3,3-dimetil-1-(4sulfonatobutil)indolin-2-iliden]-3,5-(propan-1,3-diil)-1,3,5-heptatrien-1-il]-3,3-dimetil5-[N-(2,3,4,5,6-pentahidroksiheksil)-aminokarbonil](3H)indolio]butansulfonat, natrijeva sol (primjer 45b). nakon 10 minuta biti će reakcijska mješavina sa suhim ledom pomiješana i sa 210 mg (1 mmol) tiokarbonildiimidazola dodano. Nakon 45 min biti će boja sa dietierom precipitirana, a čvrsta tvar centrifugiranjem izolirana. Za pročišćavanje može se na RP-materijalu kromatografirati.

Iskoristivost: 78 mg (43% d.Th.)

Analiza (odnosi se na supstance bez otapala):

ber. :	C 55,07	H 6,02	N 5,35	S 9,06	O 22,01	Na 1,76
gef. :	C 54,89	H 6,20	N 5,24	S 9,58		Na 1,54

Analogno sintezi prema primjeru 14-16 i 18-27 a (sinteza čvrste faze peptida) biti će VIP-analog HSWAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLSILN na čvrstoj fazi sintetiziran. Boja 4- [2- [4- (4-izotiocijanatotiofeniloksi) -7- [5- N- (2,3,4,5,6 -pentahidroksiheksil)aminokarbonil-3,3-dimetil-1-(4-sulfonatobutil)indolin-2-iliden]-3,5-(propan-1,3-diil)-1,3,5-heptatrien-1-il]-3,3-dimetil-5-[N-(2,3,4,5,6-pentahidroksiheksil)-aminokarbonil](3H)indolio]butansulfonat, natrijeva sol biti će na peptid, N-terminus povezana i prema primjeru 14-16 i 18-27 c (odcepljenje zaštitnih skupina i odvajanje konjugata boje i peptida) biti će taj konjugat izoliran i pročišćen.

Na analogan način mogu daljnje simetrične hidrofilne boje na slijedećim gradivnim elementima biti nadograđeni:

Hidrofilni indolenin-derivati sa hidroksialkilmisupstituentima: (spravljeni prema primjeru 44 a).

- 5-N-(2,3-dihidroksipropil)-N-metilaminokarbonil-1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimetil (3H) indolenin
- 5-N-(hidroksietil)-aminokarbonil-1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimetil (3H) indolenin
- 5-N-(2,3-dihidroksipropil)-N-(hidroksietil)-aminokarbonil-1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimetil (3H) indolenin
- 5-N,N-(bi-hidroksietil)-aminokarbonil-1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimetil (3H) indolenin
- 5-N,N-(2,3,4,5,6-pentahidroksiheksil)-aminokarbonil-1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimetil (3H) indolenin
- 5-N-(1,3,4-trihidroksibutil-2-il)-N-metilaminokarbonil-1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimetil (3H) indolenin

Primjer 46

7-[5-N-(2,3-dihidroksipropil)aminokarbonil-3,3-dimetil-1-(4-sulfonatobutil)indolin-2-iliden] -1,3,5- heptatrien -1-il]-3,3 -dimetil -5-karboksi (3H) aminokarbonil] (3H) indolio] butansulfonat, natrijeva sol

Otopina od 2,35 g (5,71 mmol) 5-N-(2,3-dihidroksipropil)aminokarbonil-1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimetil (3H) indolenin (primjer 44a) i 1,57 g (5,5 mmol) glutakonaldehid-dianilid-hidroklorid u 25 ml anhidrida ostene kiseline, biti će 30 min miješana, pri 120°C. Nastavno se doda 2,4 g (7,1 mmol) 5-karboksi-1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimetil (3H) indolenin, 1,71 g natrijacetata, 22 ml anhidrida octene kiseline i 8,6 ml octene kiseline. Reakcijska mješavina se miješa 1 sat, pri 120°C, ohladi na sobnu temperaturu i precipitira produkt sa dietilnim eterom. Sirovina se kromatografira preko RP-materijala. Iskorišćenost: 9,1 g (40% d.Th.)

Analiza (odnosi se na supstance bez otapala):

ber. :	C 54,47	H 6,03	N 5,03	S 7,67	O 21,05	Na 2,75
gef. :	C 54,26	H 6,12	N 5,00	S 7,49		Na 2,48

Analogno sintezi prema primjeru 14-16 i 18-27 a (sinteza čvrste faze peptida) biti će VIP-analog HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLSILN na čvrstoj fazi sintetiziran. Boja 7- [5- N- (2,3-dihidroksipropil) aminokarbonil -3,3-dimetil -1- (4-sulfonatobutil) indolin-2-iliden]-1,3,5-heptatrien-1-il]-3,3-dimetil-5-karboksi (3H)indolio]butansulfonat, natrijeva sol biti će na peptid, N-terminus povezana i prema primjeru 14-16 i 18-27 c (odcepljenje zaštitnih skupina i odvajanje konjugata boje i peptida) biti će taj konjugat izoliran i pročišćen pomoću HPLC.

Na analogan način mogu daljnje nesimetrične hidrofilne boje na slijedećim gradivnim elementima biti nadograđeni:

Hidrofilni indolenin-derivati sa hidroksialkilmisupstituentima: (spravljeni prema primjeru 44 a).

- 5-N-(2,3-dihidroksipropil)-N-metilaminokarbonil-1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimetil (3H) indolenin
- 5-N-(dihidroksietil)-aminokarbonil-1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimetil (3H) indolenin
- 5-N-(2,3-dihidroksipropil)-N-(hidroksietil)-aminokarbonil-1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimetil (3H) indolenin
- 5-N,N-(bi-dihidroksietil)-aminokarbonil-1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimetil (3H) indolenin
- 5-N,N-(2,3,4,5,6-pentahidroksietil)-aminokarbonil-1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimetil (3H) indolenin
- 5-N-(1,3,4-trihidroksibutil-2-il)-N-metilaminokarbonil-1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimetil (3H) indolenin

Indolenin derivati sa karboksilnim skupinama:

- 5-karboksi-1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimetil (3H) indolenin
- 5-karboksietil-1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimetil (3H) indolenin
- 5-karboksi-1-(3-sulfopropil)-2,3,3-trimetil (3H) indolenin
- 5-karboksietil-1-(3-sulfopropil)-2,3,3-trimetil (3H) indolenin
- 5-karboksi-1-(2-sulfoetil)-2,3,3-trimetil (3H) indolenin

f) 5-karboksimetil-1-(2-sulfoetil)-2,3,3-trimetil (3H) indolenin

Dialin derivati za reakcije sa o. g. indoleninima zu stvaranje mono-, di- ili trikarbocijanina:

- a) glutakonaldehid-dianilid-hidroklorid
- b) malonaldehid-bi-fenilimin-hidroklorid
- c) N,N-difenilformamid
- d) N-[5-anilino-2,4-(propan-1,3-diil)-2,4-pentadien-1-iliden]anilinium-klorid
- e) N-[5-anilino-2,4-(etan-1,2-diil)-2,4-pentadien-1-iliden]anilinium-klorid
- f) N-[5-anilino-3-klor-2,4-(propan-1,3-diil)-2,4-pentadien-1-iliden]anilinium-klorid
- g) N-[5-anilino-3-klor-2,4-(etan-1,2-diil)-2,4-pentadien-1-iliden]anilinium-klorid

Primjer 47

7-[5-N-(1,3,4-trihidroksibut-2-il)aminokarbonil-3,3-dimetil-1-(4-sulfonatobutil)indolin-2-iliden]-1,3,5-heptatrien-1-il]-3,3-dimetil-5-N-(1,3,4-trihidroksibut-2-il)aminokarbonil[(3H)indolio]butansulfonat, natrijeva sol,

N-hidroksisukcinimidester

- a) 4-[2-[4-klor-7-[5-N-(1,3,4-trihidroksibut-2-il)aminokarbonil-3,3-dimetil-1-(4-sulfonatobutil)indolin-2-iliden]-3,5-[2-(metoksikarbonil)propan-1,3-diil]-1,3,5-heptatrien-1-il]-3,3-dimetil-5-[N-(1,3,4-trihidroksibut-2-il)-aminokarbonil](3H)indolio]butansulfonat, natrijeva sol

Otopini od 0,8 g (5 mmol) 4-(metoksikarbonil)-cikloheksanon u 5 ml diklormetan, doda se 5,5 ml (10 mmol) fosforoksiklorida i 6 ml N,N-dimetilformamida, pri 0°C. Nastavno se zagrijava 1 sat u povratnom toku. Diklormetan se destilira k tome i doda, pri max. 5°C anilin i 10 ml metanol. Reakcijska mješavina se izlije na led, doda se 5 ml koncentrirane solne kiseline i ostavi da međuprodukt 5 sati, pri 0°C, iskristalizira. Kristali se odvoje i upotrijebe, bez daljnjeg pročišćavanja u slijedeću reakciju. Za to se otopi kristali u suhom metanolu i doda se 4,4 g (10 mmol) 5-N-(2,3,4,5,6-pentahidroksiheksil)-aminokarbonil-1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimetil(3H)indolenin (vidi primjer 45) i 0,8 g suhog natrij acetata. Sve se zagrijava 1 sat na povratnom hladilu, odfiltrira čvrsta tvar te otpari filtrat do suhog. Ostatak se za pročišćavanje kromatografira.

Iskoristivost: 3,25 g (58% d.Th.)

Analiza (odnosi se na supstance slobodne od otapala):

ber.:	C 54,90	H 6,14	Cl 3,18	N 5,02	S 5,75	O 22,94	Na 2,06
geč.:	C 54,76	H 6,03	Cl 2,92	N 4,91	S 5,60		Na 1,83

- b) 7-[5-N-(1,3,4-trihidroksibut-2-il)aminokarbonil-3,3-dimetil-1-(4-sulfonatobutil)indolin-2-iliden]-3,5-(2-karboksipropan-1,3-diil)-1,3,5-heptatrien-1-il]-3,3-dimetil-5-N-(1,3,4-trihidroksibut-2-il)aminokarbonil[(3H)indolio]butansulfonat, natrijeva sol

Jedna mješavina od 10 mg (0,4 mmol) natrijhidrida i 80 mg (1,3 mmol) etantiola u 10 ml suhog N,N-dimetilformamida biti će, pod dušikom, 30 minuta pri sobnoj temp., miješano. Nastavno se doda 112 mg (0,1 mmol) 4-[2-[4-klor-7-[5-N-(1,3,4-trihidroksibut-2-il)aminokarbonil-3,3-dimetil-1-(4-sulfonatobutil)indolin-2-iliden]-3,5-[2-(metoksikarbonil)propan-1,3-diil]-1,3,5-heptatrien-1-il]-3,3-dimetil-5-[N-(1,3,4-trihidroksibut-2-il)-aminokarbonil](3H)indolio]butansulfonat, natrijeva sol (primjer 47 a) u 3 ml N,N-dimetilformamida. Reakcijska mješavina će biti 2 sata, pri 100°C zagrijavana i nakon što se ohladi na sobnu temperaturu, pomiješana sa ugljičnim dioksidom. Smjesa će biti otparena na rotacionom otparivaču do suha, a ostatak će biti ekstrahiran sa vrućim etanolom. Ekstrakt će biti otparen do suha i kromatografiran.

Iskoristivost: 75 mg (67% d.Th.)

Analiza (odnosi se na supstance slobodne od otapala):

ber.:	C 55,27	H 6,33	N 5,25	S 6,01	O 23,99	Na 2,15
geč.:	C 56,13	H 6,46	N 5,12	S 5,87		Na 1,88

- c) 7-[5-N-(1,3,4-trihidroksibut-2-il)aminokarbonil-3,3-dimetil-1-(4-sulfonatobutil)indolin-2-iliden]-3,5-(2-karboksipropan-1,3-diil)-1,3,5-heptatrien-1-il]-3,3-dimetil-5-N-(1,3,4-trihidroksibut-2-il)aminokarbonil[(3H)indolio]butansulfonat-N-hidroksisukcinimidester, natrijeva sol

Za spravljanje aktivnog estera 14 mg (0,12 mmol) N-hidroksisukcinimida i 64 mg (0,06 mmol) karbonske kiseline u 2 ml N,N-dimetilformamida. Nakon 15 min. doda se 25 mg (0,12 mmol) dicikloheksilkarbodiimid te se miješa preko noći pri sobnoj temp. Aktivni ester bio je pomoću preparativnog HPLC-a pročišćen.

Iskoristivost: 60 mg (86% d. Th.)

Analiza (odnosi se na supstance slobodne od otapala):

ber.:	C 55,71	H 6,06	N 6,02	S 5,51	O 24,73	Na 1,97
gef.:	C 55,59	H 6,22	N 5,93	S 5,37		Na 1,75

Analogno sintezi prema primjeru 14-16 i 18-27 a (sinteza čvrste faze peptida) biti će VIP-analog HSDAVFTDNY TRLRKAMAVK KYLNSILN na čvrstoj fazi sintetiziran. Boja 7- [5- N- (2,3-dihidroksipropil) aminokarbonil -3,3-dimetil -1- (4-sulfonatobutil) indolin-2-iliden]-3,5-(2-karboksipropil-1,3-diil)-1,3,5-heptatrien-1-il]-3,3-dimetil-5-N-1,3,4-trihidroksibut-2-il)-aminokarbonil (3H)indolio]butansulfonat, natrijeva sol biti će prema primjeru 14-16 i 18-27 c (povezivanje boje) na peptid N-terminus i prema primjeru 14-16 i 18-27 c (odejpljenje zaštitnih skupina i odvajanje konjugata boja-peptid) biti će taj konjugat izoliran i pročišćen.

Primjer 48

7-[5-N-(1,3,4-trihidroksibut-2-il)aminokarbonil-3,3-dimetil-1-(4-sulfonatobutil)indolin-2-iliden]-3,5-(2-karboksipropil-1,3-diil)-1,3,5-heptatrien-1-il]-3,3-dimetil-5-N-(1,3,4-trihidroksibut-2-il)aminokarbonil(3H)indolio]butansulfonat, natrijeva sol

a) 5-N-(11-aminoundecil)aminokarbonil-1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimetil(3H)indolenin

340 mg (1 mmol) 5-karboksi-1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimetil(3H)indolenin (Anal. Biochem. 217,197, 1994) biti će u 5 ml apsolutnog N,N-dimetilformamida i 1 ml piridina položeno i sa 0,5 g (2 mmol) disukcinimidilkarbonata pomiješano. Nakon 3 sata doda se 0,805 g (4 mmol) 11-aminoundekanske kiseline. Miješa se preko noći pri sobnoj temp., otpari se do suha i miješa ostatak sa dietileterom. Čvrsta tvar se odstrani i pročisti kromatografski na RP-materijalu. Iskoristivost: 0,37 g (71% d. Th.)

Analiza (odnosi se na supstance slobodne od otapala):

ber.:	C 62,04	H 8,13	N 5,36	S 6,13	O 18,37
gef.:	C 61,88	H 8,23	N 5,17	S 6,02	

b) 7-[5-N-(1,3,4-trihidroksibut-2-il)aminokarbonil-3,3-dimetil-1-(4-sulfonatobutil)indolin-2-iliden]-3,5-(2-karboksipropil-1,3-diil)-1,3,5-heptatrien-1-il]-3,3-dimetil-5-N-(1,3,4-trihidroksibut-2-il)aminokarbonil(3H)indolio]butansulfonat, natrijeva sol

Jedna mješavina od 0,35 g (0,67 mmol) 5-N-(11-aminoundecila)aminokarbonil-1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimetil (3H) indolenin (primjer 48a) i 0,18 g (0,645 mmol) glutakonaldehidianila u 3 ml anhidrida octene kiseline biti će 20 min, pri 110°C miješano. Nastavno doda se 344 mg (0,83 mmol) 5-N-(2,3-dihidroksipropil)-aminokarbonil-1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimetil (3H)indolenin (primjer 44a), 0,2 g natrijacetata, 3 ml anhidrida octene kiseline u 1 ml octene kiseline. Reakcijska mješavina miješa se pri 110°C, 2 sata, ohladi na sobnu temp. i precipitira produkt sa dietileterom. Sirovi produkt se kromatografira preko RP-materijala. Iskoristivost: 0,41 g (60% d. Th.)

Analiza (odnosi se na supstance slobodne od otapala):

ber.:	C 60,13	H 7,02	N 5,50	S 6,29	O 18,04	Na 2,26
gef.:	C 59,96	H 7,14	N 5,33	S 6,15		Na 2,11

Analogno sintezi prema primjeru 14-16 i 18-27 a (sinteza čvrste faze peptida) biti će VIP-analog HSDAVFTDNY TRLRKQMVK KYLNSILN na čvrstoj fazi sintetiziran. Boja 7- [5- N- (1,3,4-trihidroksibut-2-il)-aminokarbonil -3,3-dimetil -1- (4-sulfonatobutil) indolin-2-iliden]-3,5-(2-karboksipropil-1,3-diil)-1,3,5-heptatrien-1-il]-3,3-dimetil-5-N-1,3,4-trihidroksibut-2-il)-aminokarbonil (3H)indolio]butansulfonat, natrijeva sol biti će prema primjeru 14-16 i 18-27 c (povezivanje boje) na peptid N-terminus i prema primjeru 14-16 i 18-27 c (povezivanje boje) na peptid N-terminus, povezan prema primjeru 14-16 i 18-27c (odejpljenje zaštitnih skupina i odvajanje konjugata boja-peptid) biti će taj konjugat izoliran i pročišćen.

Daljnje izumom predložene boje mogu prema primjeru 44a i b biti spravljene, pri čemu se na mjestu 11-aminoundekanske kiseline u primjeru 48a slijedeće aminokiseline i u primjeru 46 navedene indoleninderivate sa hidroksialkilsupstituenti a)-f) primjenjuju:

- i). glicin
- ii). alanin

- iii). β -alanin
 iv). 4-aminobutanska kiselina
 v). 6-aminoheksanska kiselina
 vi). $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3\text{CH}_2\text{COOH}$ (TH 53, 20, 6977)
 5 vii). $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4\text{CH}_2\text{COOH}$ (JOC 63, 5, 1728, 1998)
 viii). $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4-\text{CO}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ (Let. Pept. Sci. 6, 135, 1999)
 ix). $\text{HCl} \cdot \text{H}_2\text{N}-\text{PEG}-\text{COOH}$ (MW 3400 g/mol; Shearwater Polymers Inc., USA)

Primjer 49

10 4-[2-[4-(4-(N-(4-aza-6-brom-5-oksoheksil)aminokarbonil-etil)feniloksi)-7-[5-N-(dihidroksipropil)aminokarbonil-3,3-dimetil-1-(4-sulfonatobutil)indolin-2-iliden]-3,5-(propan-1,3-diil)-1,3,5-heptatrien-1-il]-5-N-(dihidroksipropil)aminokarbonil-3,3-dimetil(3H) indolio]butansulfonat, natrijeva sol

15 a) [3-[N-(terc.-butoksikarbonil)amino]propil]-N'-(bromacetil)-amid

2,5 g (14,4 mmol) [3-[N-(terc.-butoksikarbonil)amino]propil]-amida biti će u 15 ml dioksana otopljeno i nakon dodatka 4,4 ml trietilamina, pri 0°C, sa 3,2 g (16 mmol) bromacetilbromida pomiješano. Smjesa se miješa preko noći, pri sobnoj temperaturi, a zatim se doda daljnjih 320 mg bromacetilbromida. Nakon 2 sata, pri sobnoj temp., talog će biti odstranjen, otopina koncentrirana, a ostatak u etilnom esteru octene kiseline otopljen. Otopina se ispire sa vodom, a
 20 organska faza se suši preko natrijeva sulfata.
 Iskoristivost: 3,2 g (75% d. Th.).

Analiza (odnosi se na supstance slobodne od otapala):

ber. :	C 40,69	H 6,49	Br 27,07	N 9,49	O 16,26
gef. :	C 40,50	H 6,37	Br 26,89	N 9,58	

25 b) [3-[N-(terc.-bromacetil)amino]propil] amin, hidroklorid

3,1 g (10,5 mmol) [3-[N-(terc.-butoksikarbonil)amino]-N'-(bromacetil)-amida (primjer 49a) biti će sa 50 mmol 1M
 30 solne kiseline u etilnom esteru octene kiseline za 5 sati pomiješano, pri sobnoj temp. Talog/produkt će biti odstranjen, a
 ostatak u etilnom esteru octene kiseline ispran.
 Iskoristivost: 2,3 g (95% d. Th.).

Analiza (odnosi se na supstance slobodne od otapala):

ber. :	C 25,94	H 5,22	Cl 15,31	Br 34,51	N 12,10	O 6,91
gef. :	C 25,76	H 5,41	Cl 15,55	Br 34,34	N 11,97	

35 c) 4-[2-[4-(4-(N-(4-aza-6-brom-5-oksoheksil)aminokarbonil-etil)feniloksi)-7-[5-N-(dihidroksipropil)aminokarbonil-3,3-dimetil-1-(4-sulfonatobutil)indolin-2-iliden]-3,5-(propan-1,3-diil)-1,3,5-heptatrien-1-il]-5-N-(dihidroksipropil)aminokarbonil-3,3-dimetil(3H) indolio]butansulfonat, natrijeva sol

40 121 mg (0,1 mmol) 4-[2-[4-(4-(2-karboksietilfeniloksi)-7-[5-N-(dihidroksipropil)aminokarbonil-3,3-dimetil-1-(4-sulfonatobutil)indolin-2-iliden]-3,5-(propan-1,3-diil)-1,3,5-heptatrien-1-il]-5-N-(dihidroksipropil)aminokarbonil-3,3-dimetil(3H) indolio]butansulfonat, natrijeva sol, N-hidroksisukcinimidester (primjer 44c) biti će u 0,5 ml N,N-dimetilformamida otopljeno, sa 0,06 ml trietilamina i 70 mg (0,3 mmol) [3-[N-(bromacetil)amino]propil]amina, hidroklorida (primjer 49b) pomiješano.

45 Smjesa se miješa 4 sata, pri 60°C, ohladi nastavno na sobnu temperaturu, a produkt se istaloži sa dietileterom. Čvrsti ostatak se odstrani i obilno ispere sa dietileterom.
 Iskoristivost: 0,11 mg (80% d. Th.)

Analiza (odnosi se na supstance bez otapala):

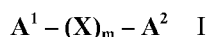
ber. :	C 56,17	H 6,18	Br 6,13	N 6,44	S 4,92	Na 1,76	O 18,40
gef. :	C 55,96	H 6,26	Br 6,01	N 6,27	S 4,81	Na 1,53	

50 Analogno sintezi prema primjeru 14-16 i 18-27 a (sinteza čvrste faze peptida) biti će VIP-analog HSDAVFTDNY TRLRKQCAVK KYLNSLLN na čvrstoj fazi sintetiziran

Bromidna boja 4-[2-[4-(4-(N-(4-aza-6-brom-5-okso-heksil) aminokarboniletil) feniloksi)-7-[5-N-(dihidroksipropil) aminokarbonil-3,3-dimetil-1-(4-sulfonatobutil)indolin-2-iliden]-3,5-(propan-1,3-diil)-1,3,5-heptatrien-1-il]-5-N-(di hidroksipropil)aminokarbonil-3,3-dimetil(3H) indolio]butansulfonat, natrijeva sol, biti će prema primjeru 17 na peptidni N-terminus nadovezan, a prema primjeru 14-16 i 18-27 c (odcepljivanje zaštitnih skupina i odvajanje konjugata peptid-
5 boja) taj konjugat izoliran i pročišćen.

PATENTNI ZAHTEJEVI

1. Konjugati peptida i polimetinskih boja, opće formule (I)



pri čemu

X za jednu α , β ili γ -amino kiselina sa D ili L-konfiguracijom i

m za jedan broj od 5 do 30 stoji,

pri čemu rezultirajuća sekvenca aminokiselina $(X)_m$ ravnolančane prirode ili preko disulfidnog mosta između 2 cisteina ili homocisteina ili amidno između N- i C-terminusa može biti ciklizirana i za sekvencu aminokiseline vazoaktivnog intestinalnog peptida (VIP), somatostatina ili neurotenzina, ili za fragmente, dijelove sekvenci, derivate ili analoga VIP, somatostatina ili neurotenzina, stoji

A^1 za jedan atom vodika, jedan acetilni ostatak ili jedan alkilni ostatak sa do 10 C atoma, koji isto tako sa 1 do 3 karboksi-skupine i/ili 1 do 6 hidroksi skupine može biti supstituiran, ili jedan poli(oksietilen)ostatak sa 2 do 30 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{O}-$ jedinica ili jednu molekulu boje iz klase polimetinskih boja, koje pokazuju najmanje jedan apsorpcijski maksimum u području od 380 do 1200 nm,

stoji

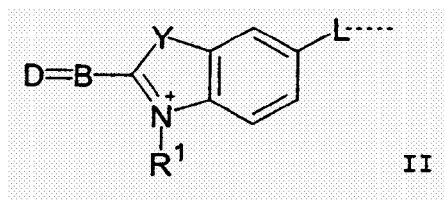
A^2 za jednu hidroksi skupinu, jednu amino skupinu ili jednu molekulu boja iz klase polimetinskih boja, koje pokazuju najmanje jedan apsorpcijski maksimum u području od 380 do 1200 nm, stoji

u uvjetima, da najmanje jedan od ostataka A^1 ili A^2 je jedna molekula boje iz klase polimetinskih boja, koje pokazuju najmanje jedan apsorpcijski maksimum u području od 380 do 1200 nm, predstavlja,

pri čemu za slučaj, da A^1 i/ili A^2 jednu molekulu boje iz klase polimetinskih boja, koje pokazuju najmanje jedan apsorpcijski maksimum u području od 380 do 1200 nm, predstavlja, A^1 na N-terminalnu amino skupinu, a A^2 na jednu amino skupinu ili aminokiselinu lizin ili na jednu hidroksilnu skupinu aminokiseline serina u bilo kojoj poziciji unutar sekvence aminokiselina $(X)_m$ je povezana,

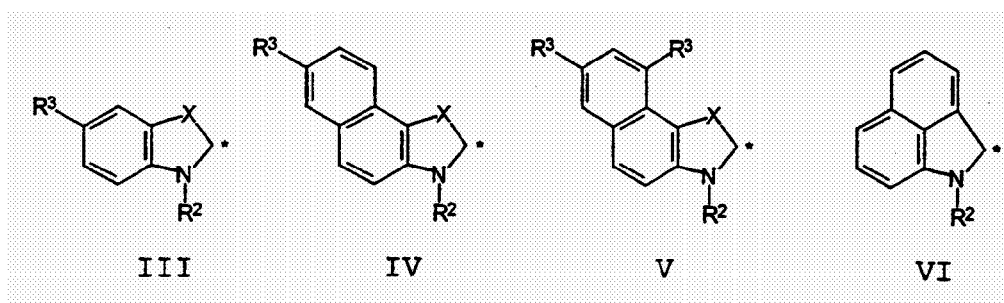
i njihove fiziološki podnošljive soli.

2. Spojevi prema zahtjevu 1, koji su **naznačeni time**, da molekula boje A^1 i/ili A^2 za jedan cijanin-, skvarilij-, krokonij-, merocijanin- ili oksonol-boju stoji.
3. Spojevi prema zahtjevu 1 ili 2, koji su **naznačeni time**, da molekula boje A^1 i/ili A^2 za jedan cijanin- odnosno skvarilij-boju opće formule II

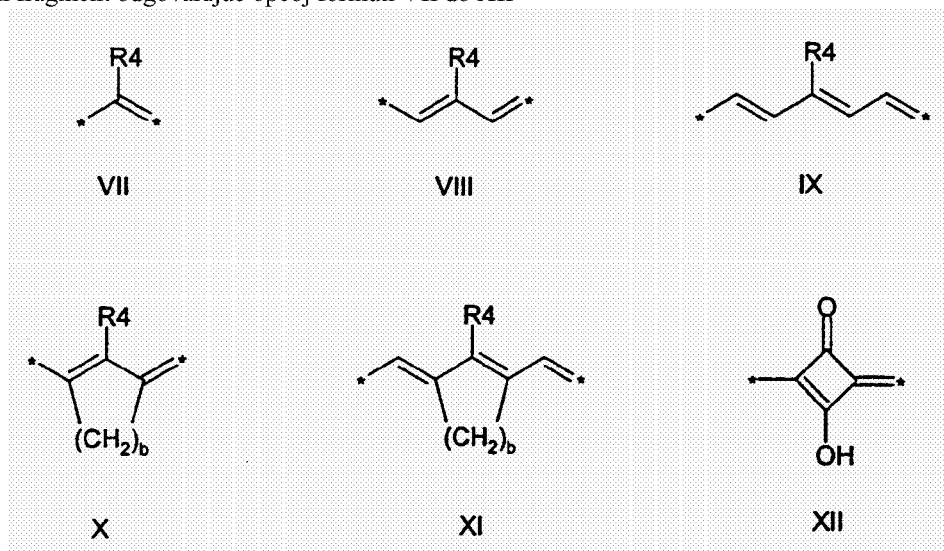


pri čemu

D za jedan fragment odgovarajuć općoj formuli III do IV, pri čemu s jednom zvjezdicom označena pozicija označava mjesto povezivanja sa B, stoji,



B za jedan fragment odgovarajuć općoj formuli VII do XII



5 R^1 i R^2 za E^1 , R^3 za jedan fluor-, klor-, brom-, jod- atom ili jednu nitro-skupinu ili za jedan ostatak $-COOE^1$, $-CONE^1E^2$, $-NHCOE^1$, $-NHCONHE^1$, $-NE^1NE^2$, $-OE^1$, $-OSO_3E^1$, $-SO_3E^1$, $-SO_2NHE^1$, $-E^1$,

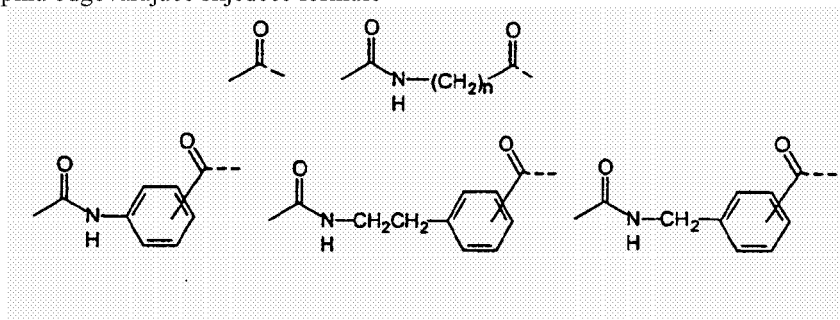
pri čemu E^1 i E^2 neovisno međusobno za jedan atom vodika, jedan C_1 - C_4 -sulfoalkilni lanac, jedan zasićeni ili nezasićeni C_1 - C_{40} -alkilni lanac, pri čemu lanac ili dijelovi tog lanca isto tako jednu ili više aromatskih ili zasićenih cikličkih C_5 - C_6 - ili bi-cikličkih C_{10} -jedinica mogu formirati, stoje, a pri tom C_1 - C_{50} -alkilni lanac od 0 do 15 atoma kisika i/ili od 0 do 3 karbonilne skupine je prekinut i/ili sa 0 do 5 hidroksi skupina je supstituiran, stoji,

15 R^4 za jedan atom vodika, jedan fluor, klor, brom, jod - atom ili jedan razgranjeni ili ravnolančani C_1 - C_{10} -alkilni lanac, stoji,

15 b broj 2 ili 3 označava,

X i Y, neovisno međusobno, O, S, Se, $-CH=CH-$ ili $C(CH_3)_2$ označava,

L za jednu skupinu odgovarajuće slijedeće formule

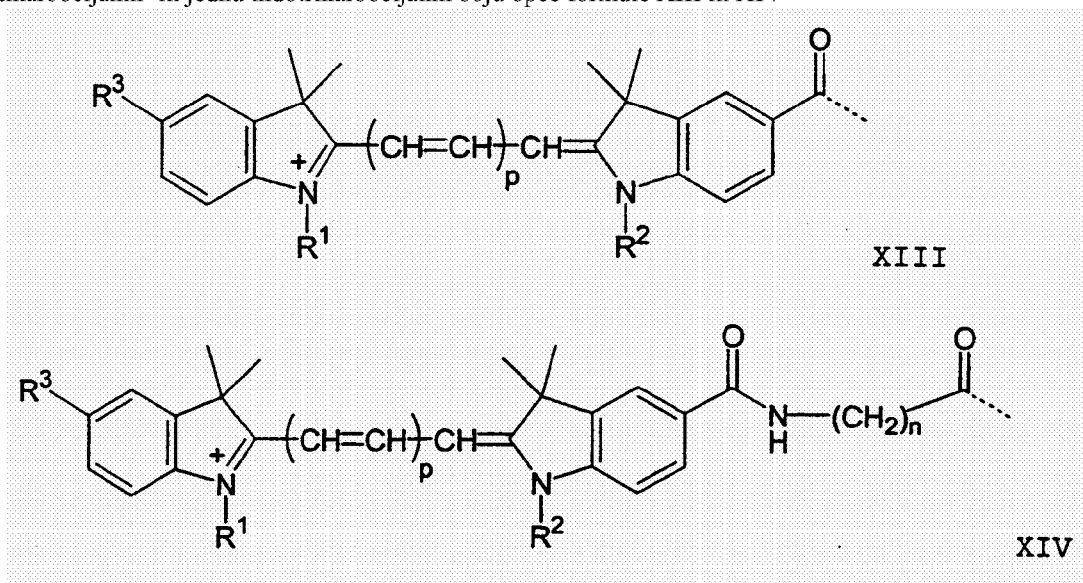


20 pri čemu
n označuje jedan broj od 1 do 10,

stoji.

25 4. Spojevi prema zahtjevima 1 do 3, **naznačeni time**, da molekula boje A^1 i/ili A^2 za jednu indokarbocijanin-, jednu indodikarbocijanin- ili jednu indotrikarbocijanin-boju stoji.

5. Spojevi prema zahtjevu 4, **naznačeni time**, da molekula boje A1 i/ili A2 za jednu indokarbocijanin-, jednu indodikarbocijanin- ili jednu indotrikarbocijanin boju opće formule XIII ili XIV



pri čemu

p za 1,2 ili 3,

n za 1,2,3,4 ili 10 stoji,

R^1 i R^2 neovisni međusobno, za jedan 4-sulfobutil-, 3-sulfopropil-, 2-sulfoetil-, 3-metil, 3-sulfopropil-, metil-, etil-, ili propil - ostatak, stoje,

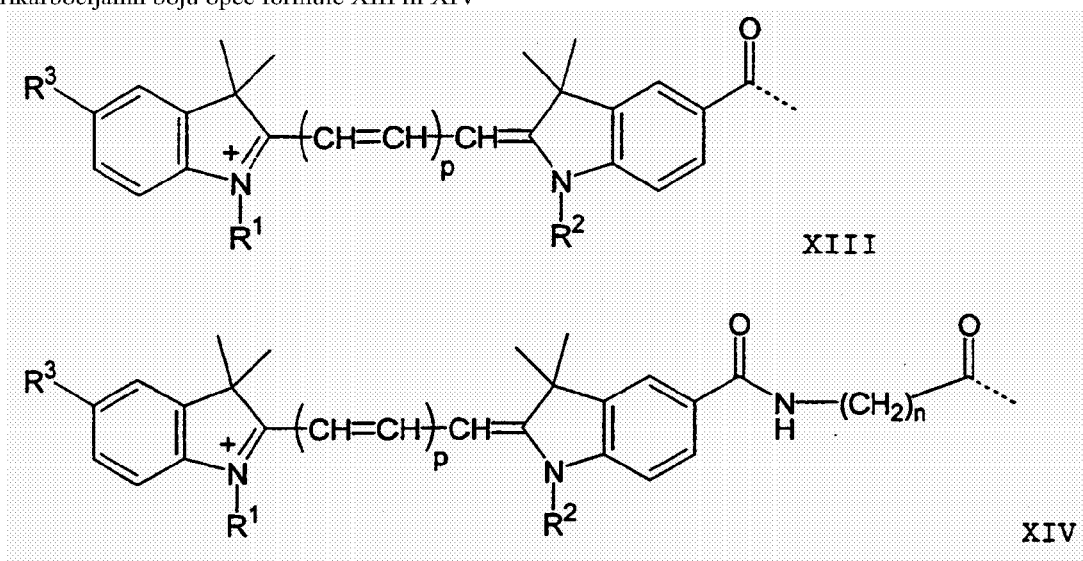
a

R^3 za jedan vodik, klor, brom, jod – atom ili jednu nitro skupinu ili za jedan ostatak $-\text{COO}^1\text{E}^1$, $-\text{CONE}^1\text{E}^2$, $-\text{NHCOE}^1$, $-\text{NHCONHE}^1$, $-\text{NE}^1\text{E}^2$, $-\text{OE}^1$, $-\text{OSO}_3\text{E}^1$, $-\text{SO}_3\text{E}^1$, $-\text{SO}_2\text{NHE}^1$, $-\text{E}^1$,

pri čemu su E^1 i E^2 međusobno neovisni, za jedan atom vodika ili za jedan metil, etil ili C_3 - C_6 -alkilni ostatak, koji je od 0 do 2 atoma kisika i/ili od 0 do 1 karbonilnih skupina prekinut i/ili sa 0 do 5 hidroksilnih skupina supstituiran, ili za jedan poli(oksietilen)glikolni ostatak sa 2 do 30 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ jedinica stoji,

6. Spojevi prema zahtjevu 4, **nazanačeni time**, da molekula boje A^1 i/ili A^2 za jednu indokarbocijanin, jednu indodikarbocijanin ili jednu

indotrikarbocijanin boju opće formule XIII ili XIV



pri čemu

p za 1,2 ili 3,

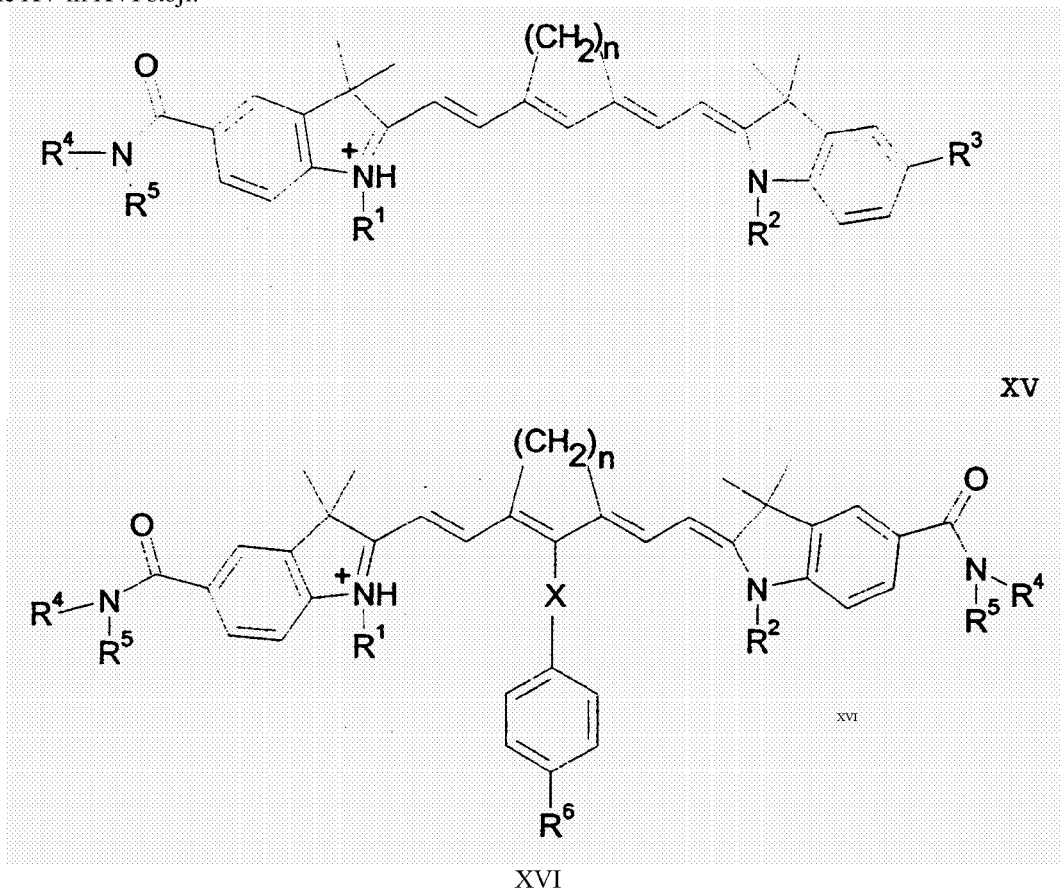
n za 1,2 ili 4,

R^1 i R^2 , neovisni međusobno, za jedan 4-sulfobutil, ili 3-sulfopropil ostatak,

R^3 za vodik ili za jedan ostatak $-\text{COOE}^1$ ili $-\text{CONHE}^1$,

pri čemu E^1 jedan atom vodika ili jedan metil, etil, ili jedan C_3 - C_6 -alkilni ostatak, koji od 0 do 2 atoma kisika i/ili je za od 0 do 1 karbonilnu skupinu prekinut i/ili sa 0 do 5 hidroksilnih skupina supstituiran, ima značenje,

7. Spojevi prema zahtjevu 4, **naznačeni time**, da molekula boje A^1 i/ili A^2 za jednu indotrikarbocijanin boju opće formule XV ili XVI stoji:

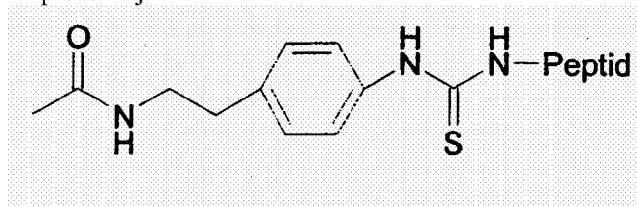


pri čemu
n za 2 ili 3 stoji,

R^1 i R^2 , međusobno neovisni, jedan 4-sulfobutil, 3-sulfopropil, ili 2-sulfoetilni ostatak predstavljaju,

R^3 za jedan ostatak $-\text{CONH-peptid}$, $-\text{CONH}-(\text{CH}_2)_m-\text{CONH-peptid}$, $-\text{CONH}-(\text{CH}_2)_n-\text{NH-CS-NH-peptid}$ ili $-\text{CONH}-(\text{CH}_2)_n-\text{NHCO-CH}_2\text{-peptid}$ sa $m=1$ do 10 i $n=2$ ili 3, stoji,

ili jednu od slijedećih skupina predstavlja:



R^4 i R^5 , međusobno neovisni, za jedan atom vodika, jedan metilni ostatak ili jedan hidroksilirani alkilni ostatak, stoji,

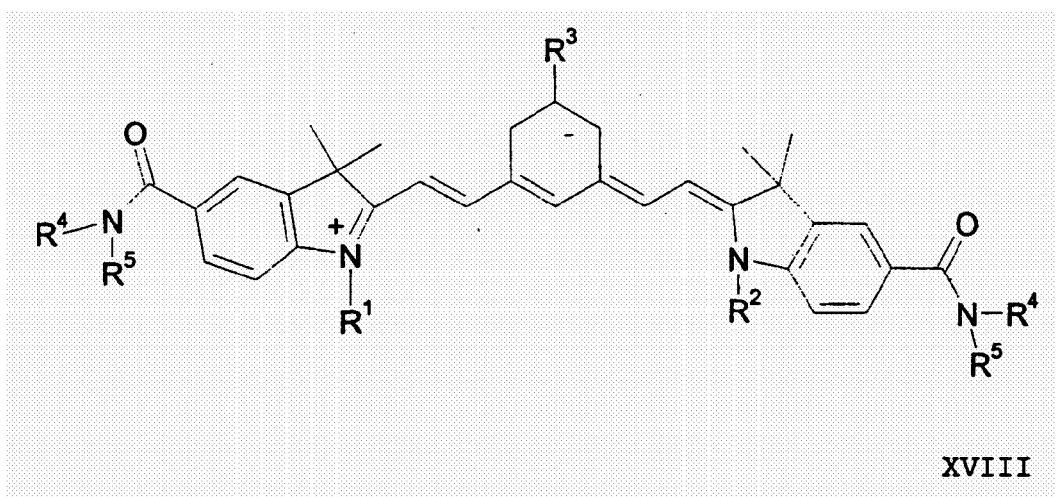
R^6 za jednu od slijedećih skupina stoji:

$-(\text{CH}_2)_m-\text{CONH-peptid}$ sa $m=0$ do 2,

$-(\text{CH}_2)_m-\text{NH-CS-NH-peptid}$ sa $m=0$ do 2,

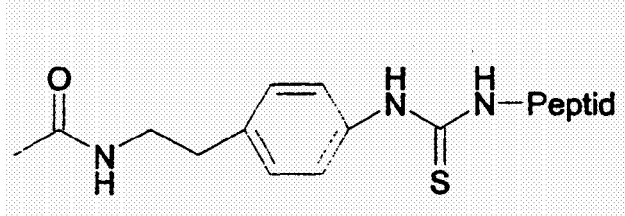
i X za jedan atom vodika ili jedan atom sumpora, stoji.

8. Spojevi prema zahtjevu 4, **naznačeni time**, da molekula boje A^1 i/ili A^2 za jednu indotrikarbocijanin boju opće formule XVII stoji:



pri čemu

R^1 i R^2 međusobno neovisni, jedan 4-sulfobutil, 3-sulfopropil ili 2-sulfoetil- ostatak, predstavljaju,
 R^3 za jedan ostatak $-\text{CONH-peptid}$, $-\text{NH-CS-NH-peptid}$ sa $n=2$ ili 3 ili jednu od slijedećih skupina predstavlja:



i R^4 i R^5 , međusobno neovisni, za jedan atom vodika, jedan metilni ostatak ili jedan hidroksilirani alkilni ostatak, stoje.

9. Spojevi, prema zahtjevu 7 ili 8, **naznačeni time**, da hidroksilirani alkilni ostaci za 2-hidroksietil, 3-hidroksipropil, 2,3-dihidroksipropil, 1,3-dihidroksi-2-propil, 2,3,4-trihidroksibutil, 1,3,4-trihidroksi-2-butil, 2,3,4,5,6-pentahidroksi heksil stoje.
10. Spojevi prema zahtjevu 1, **naznačeni time**, da $(X)_m$ za sekvenzu aminokiselina nativnog vazointestinalnog peptida odgovarajuć

HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSILN

ili za fragmente, dijelove fragmenata, derivate ili analoge vazoaktivnog intestinalnog peptida, koji se sastoji od 5 do 30 aminokiselina, stoji.

11. Spojevi prema zahtjevu 1, **nazanačeni time**, da $(X)_m$ za sekvencu aminokiselina somatostatina odgovarajuću

AGCKNFFWKFTSC

ili za fragmente, dijelove sekvenci, derivate ili analoge somatostatina, koji se sastoji od 5 do 20 aminokiselina, stoji.

12. Spojevi prema zahtjevu 1, **naznačeni time**, da $(X)_m$ za sekvencu aminokiselina neurotenzina odgovarajuću

piroglutaminska kiselina – LYENKPRRPYIL

ili za fragmente, dijelove sekvenci, derivate ili analoge neurotenzina, koji se sastoje od 5 do 20 aminokiselina, stoje.

13. Spojevi prema zahtjevu 10, **naznačeni time**, da kao fragmenti, dijelovi sekvenci, derivati ili analoge vazoaktivnog intestinalnog peptida slijedeće aminokiseline su odabrane:

RLRKQMAVKKYLNSILN	RLRKQMAVKKYLNSIL	RLRKQMAVKKYLNSI
LRKQMAVKKYLNSILN	LRKQMAVKKYLNSIL	LRKQMAVKKYLNSI
RKQMAVKKYLNSILN	RKQMAVKKYLNSIL	RKQMAVKKYLNSI
KQMAVKKYLNSILN	KQMAVKKYLNSIL	KQMAVKKYLNSI
QMAVKKYLNSILN	QMAVKKYLNSIL	QMAVKKYLNSI
MAVKKYLNSILN	MAVKKYLNSIL	MAVKKYLNSI
AVKKYLNSILN	AVKKYLNSIL	AVKKYLNSI
RLRKQMAVKKYLNS	RLRKQMAVKKYLN	RLRKQMAVKKYL
LRKQMAVKKYLNS	LRKQMAVKKYLN	LRKQMAVKKYL
RKQMAVKKYLNS	RKQMAVKKYLN	RKQMAVKKYL
KQMAVKKYLNS	KQMAVKKYLN	KQMAVKKYL
QMAVKKYLNS	QMAVKKYLN	QMAVKKYL
MAVKKYLNS	MAVKKYLN	MAVKKYL
AVKKYLNS	AVKKYLN	AVKKYL

14. Spojevi prema zahtjevu 10, **naznačeni time**, da kao analoga VIP-peptida, iz slijedeće skupine sekvenci, su odabrani:

FSDAVFTDNY	TRLRKQMAVK KYLNSILN
ISDAVFTDNY	TRLRKQMAVK KYLNSILN
LSDAVFTDNY	TRLRKQMAVK KYLNSILN
HFDAVFTDNY	TRLRKQMAVK KYLNSILN
HHDAVFTDNY	TRLRKQMAVK KYLNSILN

HIDAVFTDNY	TRLRKQMAVK	KYLNSILN
HLDAVFTDNY	TRLRKQMAVK	KYLNSILN
HMDAVFTDNY	TRLRKQMAVK	KYLNSILN
HQDAVFTDNY	TRLRKQMAVK	KYLNSILN
HTDAVFTDNY	TRLRKQMAVK	KYLNSILN
HVDAVFTDNY	TRLRKQMAVK	KYLNSILN
HWDAVFTDNY	TRLRKQMAVK	KYLNSILN
HYDAVFTDNY	TRLRKQMAVK	KYLNSILN
HSAAVFTDNY	TRLRKQMAVK	KYLNSILN
HSEAVFTDNY	TRLRKQMAVK	KYLNSILN
HSAVFTDNY	TRLRKQMAVK	KYLNSILN
HSHAVFTDNY	TRLRKQMAVK	KYLNSILN
HSIAVFTDNY	TRLRKQMAVK	KYLNSILN
HSLAVFTDNY	TRLRKQMAVK	KYLNSILN
HSMVFTDNY	TRLRKQMAVK	KYLNSILN
HSWVFTDNY	TRLRKQMAVK	KYLNSILN
HSDFVFTDNY	TRLRKQMAVK	KYLNSILN
HSDGVFTDNY	TRLRKQMAVK	KYLNSILN
HSDMVFTDNY	TRLRKQMAVK	KYLNSILN
HSDQVFTDNY	TRLRKQMAVK	KYLNSILN
HSDSVFTDNY	TRLRKQMAVK	KYLNSILN
HSDWVFTDNY	TRLRKQMAVK	KYLNSILN
HSDYVFTDNY	TRLRKQMAVK	KYLNSILN
HSDAFFTDNY	TRLRKQMAVK	KYLNSILN
HSDAIFTDNY	TRLRKQMAVK	KYLNSILN
HSDALFTDNY	TRLRKQMAVK	KYLNSILN
HSDAMFTDNY	TRLRKQMAVK	KYLNSILN
HSDATFTDNY	TRLRKQMAVK	KYLNSILN
HSDAWFTDNY	TRLRKQMAVK	KYLNSILN
HSDAYFTDNY	TRLRKQMAVK	KYLNSILN
HSDAVKTDNY	TRLRKQMAVK	KYLNSILN
HSDAVFVDNY	TRLRKQMAVK	KYLNSILN
HSDAVFWDNY	TRLRKQMAVK	KYLNSILN
HSDAVFTDNY	TRLRKQMAVK	KYLNSILN
HSDAVFTDNY	TRRRKQMAVK	KYLNSILN
HSDAVFTDNY	TRWRKQMAVK	KYLNSILN

HSDAVFTDNY	TRLRFQMAVK	KYLNSILN
HSDAVFTDNY	TRLRLQMAVK	KYLNSILN
HSDAVFTDNY	TRLRMQMAVK	KYLNSILN
HSDAVFTDNY	TRLRRQMAVK	KYLNSILN
HSDAVFTDNY	TRLRKAMAVK	KYLNSILN
HSDAVFTDNY	TRLRKFMAYK	KYLNSILN
HSDAVFTDNY	TRLRKIMAVK	KYLNSILN
HSDAVFTDNY	TRLRKKMAVK	KYLNSILN
HSDAVFTDNY	TRLRKLMAYK	KYLNSILN
HSDAVFTDNY	TRLRKMMAYK	KYLNSILN
HSDAVFTDNY	TRLRKRMAYK	KYLNSILN
HSDAVFTDNY	TRLRKVMAYK	KYLNSILN
HSDAVFTDNY	TRLRKWMAYK	KYLNSILN
HSDAVFTDNY	TRLRKYMAYK	KYLNSILN
HSDAVFTDNY	TRLRKQFAVK	KYLNSILN
HSDAVFTDNY	TRLRKQIAVK	KYLNSILN
HSDAVFTDNY	TRLRKQKAVK	KYLNSILN
HSDAVFTDNY	TRLRKQLAVK	KYLNSILN
HSDAVFTDNY	TRLRKQQAVK	KYLNSILN
HSDAVFTDNY	TRLRKQRAVK	KYLNSILN
HSDAVFTDNY	TRLRKQWAVK	KYLNSILN
HSDAVFTDNY	TRLRKQMFVK	KYLNSILN
HSDAVFTDNY	TRLRKQMIVK	KYLNSILN
HSDAVFTDNY	TRLRKQMKVK	KYLNSILN
HSDAVFTDNY	TRLRKQMLVK	KYLNSILN
HSDAVFTDNY	TRLRKQMMVK	KYLNSILN
HSDAVFTDNY	TRLRKQMQVK	KYLNSILN
HSDAVFTDNY	TRLRKQMRVK	KYLNSILN
HSDAVFTDNY	TRLRKQMVVK	KYLNSILN
HSDAVFTDNY	TRLRKQMWVK	KYLNSILN
HSDAVFTDNY	TRLRKQMYVK	KYLNSILN
HSDAVFTDNY	TRLRKQMAAK	KYLNSILN
HSDAVFTDNY	TRLRKQMAIK	KYLNSILN
HSDAVFTDNY	TRLRKQMALK	KYLNSILN
HSDAVFTDNY	TRLRKQMAVR	KYLNSILN
HSDAVFTDNY	TRLRKQMAVK	RYLNSILN

HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK WYLNSILN
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KFLNSILN
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KWLNSILN
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLASILN
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLFSILN
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLISILN
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLMSILN
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLSSILN
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLVSILN
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLWSILN
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNNILN
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNRILN
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNIWILN
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNYILN
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSLLN
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSSLN
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSWLN
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSYLN
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSIFN
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSIIN
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSIWN
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILW

15. Spojevi prema zahtjevu 10, **naznačeni time**, da kao analoga VIP, jedan spoj, prema slijedećoj formuli, je odabran:



5

pri čemu X^1 , X^2 i X^3 svaku aminokiselinu mogu predstavljati.

16. Spojevi prema najmanje jednom od prethodnih zahtjeva, **naznačeni time**, da 2 do m aminokiselina, međusobno neovisno, nasuprot njihovih svih D-aminokiselina ili za druge L- ili D-aminokiseline mogu biti zamjenjene, pri čemu m ima gore navedeno značenje.
- 10 17. Spojevi prema najmanje jednom od prethodnih zahtjeva, **naznačeni time**, da najmanje jedna od aminokiselina (X)_m, međusobno neovisne, za drugu, ne prirodnu aminokiselinu ili derivat aminokiselina mogu biti zamjenjene.
18. Spojevi prema zahtjevu 17, **naznačeni time**, da kao ne prirodne aminokiseline ili derivate aminokiselina jedan od slijedećih spojeva je odabran: naftalanin, cikloheksilalanin, norleucin, norvalin, α -amino adipinska kiselina, α -amino maslačna kiselina, β -alanin, β -cikloheksilalanin, omitin, sarkozin ili δ -hidroksilizin.
- 15 19. Spojevi prema najmanje jednom od prethodnih zahtjeva, **naznačen time**, da kao analog VIP-a jedan spoj, prema slijedećoj formuli, bude odabran:



20

pri čemu X^1 , X^2 , X^3 i X^4 neprirodne aminokiseline ili derivate aminokiselina predstavljaju.

20. Spojevi prema zahtjevu 19, **naznačeni time**, da ne prirodne aminokiseline ili derivati aminokiselina iz slijedeće skupine su odabrani: naftalanin, cikloheksilalanin, norleucin, norvalin, α -amino adipinska kiselina, α -amino maslačna kiselina, β -alanin, β -cikloheksilalanin, omitin, sarkozin ili δ -hidroksilizin.
21. Spojevi prema najmanje jednom od prethodnih zahtjeva, **naznačeni time**, da pojedine amino-kiseline (X)_m za njihove odgovarajuće D-aminokiseline su zamjenjene.
- 25 22. Spojevi prema najmanje jednom od prethodnih zahtjeva, **naznačeni time**, da kao fragmenti, dijelovi sekvenci, derivati ili analoga vazoaktivnih intestinalnih peptida, retrosintetičke sekvence aminokiselina su odabrane.

23. Spojevi prema najmanje jednom od prethodnih zahtjeva, **naznačeni time**, da kao fragmenti, dijelovi sekvenci, derivati ili analoga vazoaktivnih intestinalnih peptida retrosintetičkih sekvenci aminokiselina, kod kojih 2 do m aminokiselina su zamjenjene za odgovarajuće D-aminokiseline, koje su odabrane, pri čemu m ima gore navedeno značenje.

5 24. Spojevi prema zahtjevu 10, **naznačeni time**, da kao fragmenti, dijelovi sekvenci, derivati ili analoga vazoaktivnih intestinalnih peptida su slijedeće sekvence aminokiselina odabrane:

rlrkqma ¹ vkkylnsiln	rlrkqma ¹ vkkylnsil	rlrkqma ¹ vkkylnsi
lrkqma ¹ vkkylnsiln	lrkqma ¹ vkkylnsil	lrkqma ¹ vkkylnsi
rkqma ¹ vkkylnsiln	rkqma ¹ vkkylnsil	rkqma ¹ vkkylnsi
kqma ¹ vkkylnsiln	kqma ¹ vkkylnsil	kqma ¹ vkkylnsi
qma ¹ vkkylnsiln	qma ¹ vkkylnsil	qma ¹ vkkylnsi
ma ¹ vkkylnsiln	ma ¹ vkkylnsil	ma ¹ vkkylnsi
a ¹ vkkylnsiln	a ¹ vkkylnsil	a ¹ vkkylnsi
RLRKQMA ¹ VKKY ¹ LNSILN	RLRKQMA ¹ VKKY ¹ LNSIL	RLRKQMA ¹ VKKY ¹ LNSI
LRKQMA ¹ VKKY ¹ LNSILN	LRKQMA ¹ VKKY ¹ LNSIL	LRKQMA ¹ VKKY ¹ LNSI
RKQMA ¹ VKKY ¹ LNSILN	RKQMA ¹ VKKY ¹ LNSIL	RKQMA ¹ VKKY ¹ LNSI
KQMA ¹ VKKY ¹ LNSILN	KQMA ¹ VKKY ¹ LNSIL	KQMA ¹ VKKY ¹ LNSI
QMA ¹ VKKY ¹ LNSILN	QMA ¹ VKKY ¹ LNSIL	QMA ¹ VKKY ¹ LNSI
MA ¹ VKKY ¹ LNSILN	MA ¹ VKKY ¹ LNSIL	MA ¹ VKKY ¹ LNSI

10 AvKKyLNSILN AvKKyLNSIL AvKKyLNSI

25. Spojevi prema zahtjevu 11, **naznačeni time**, da kao fragmenti, dijelovi sekvenci, derivati ili analoga somatostatina su odabrane slijedeće sekvence aminokiselina:

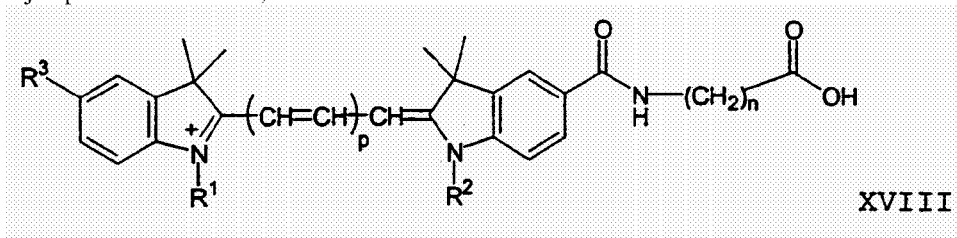
AGCKNFFwKTFTSC	AG _c KNFFwKTFTSC
AGCKNFFwKTFTSc	AG _c KNFFwKTFTSc
CKNFFwKTFTSC	cKNFFwKTFTSC
fFYwKVFT	
fCFwKVCT	f _c FwKVCT
fCYwKVCT	f _c YwKVCT
fCFwKTCT	f _c FwKTCT
fCYwKTCT	f _c YwKTCT
D-NaI-CYwKVC	D-NaI-cYwKVC
fCywK-Abu-C-NaI	f _c cywK-Abu-C-NaI

26. Spojevi prema zahtjevu 12, **naznačeni time**, da kao fragmenti, dijelovi sekvenci, derivati ili analoga neurotenzina su odabrane slijedeće sekvence aminokiselina:

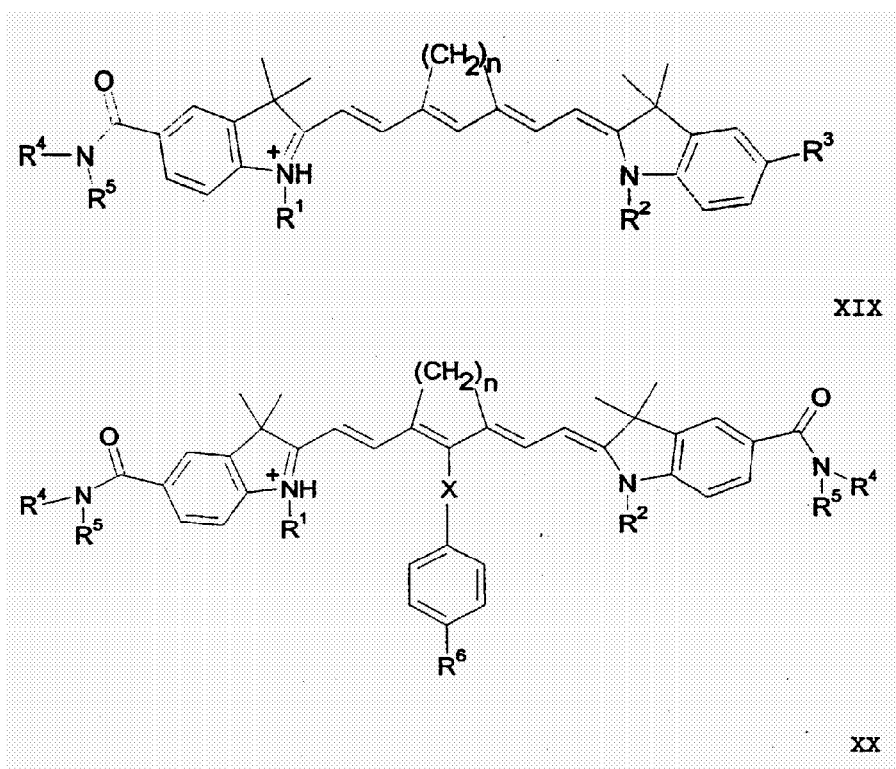
15

		pGlu-LYQNKPRRPFIL	pGlu-LYENKPRRPYI
pGlu-LYENKPRRPYIL	pGlu-LYQNKPRRPfIL	pGlu-LYENKPRRPY	
pGlu-LYQNKPRRPYIL	pGlu-LYENKPRRPWIL	pGlu-LYENKPRRP	
pGlu-LYQNKPRRPYIL	pGlu-LYENKPRRPwIL	pGlu-LYENKPRR	
pGlu-LYENKPRRPFIL	pGlu-LYQNKPRRPWIL	pGlu-LYENKPR	
pGlu-LYENKPRRPfIL	pGlu-LYQNKPRRPwIL	pGlu-LYENKP	
NKPRRPYIL	NKPRRPyIL	NKPRRPfIL	NKPRRPwIL
KPRRPYIL	KPRRPyIL	KPRRPfIL	KPRRPwIL
PRRPYIL	PRRPyIL	PRRPfIL	PRRPwIL
RRPYIL	RRPyIL	RRPwIL	

27. Primjena spojeva, prema najmanje jednom od prethodnih zahtjeva za in-vivo-dijagnostiku tumora, drugih oboljelih područja tkiva ili adenoma, pomoću optičkih postupaka otkrivanja bolesti ili za in-vivo-fluorescentnu dijagnostiku tumora, tumorskih stanica i/ili upalnih procesa na tkivima, pomoću endoskopskih postupaka za dijagnozu u gastrointestinalnom traktu, ezofagusu, bronhijalnom traktu ili mokraćnom mjehuru ili cerviksu ili za in-viv -fluorescentnu dijagnostiku i/ili apsorpcijsku dijagnostiku tumora dojke, pomoću optičke mamografija (transiluminacija ili optička tomografija dojke).
28. Postupci za endoskopsku in-vivo-fluorescentnu dijagnostiku uz primjenu spojeva prema zahtjevu 1, **naznačenih time**, da se pacijentu navedeni spojevi intravenozno apliciraju ili topički, raspršivanjem u gastrointestinalnom traktu, ezofagusu, mokraćnom mjehuru ili preko inhalacije bude raspršena u bronhijama, u slučaju raspršivanja nevezani, prekomjerni dio spoja se može ispiranjem odstraniti, endoskopsko ispitivanje pomoću lokalnog podražaja s jednom odabranom valnom duljinom u spektralnom području od 380 do 1200 nm i preko lokalno ovisne detekcije specifičnih, od boje emitiranih fluorescentnih zračenja, biti će provedeno.
29. Optička dijagnostika za in-vivo-dijagnostiku oboljelih područja tkiva, **naznačenih time**, da najmanje jedan spoj prema zahtjevu 1, zajedno sa uobičajenim pomoćnim i/ili nosivim tvarima, kao i sredstvima za razrjeđivanje, sadrži.
30. Cijaninske boje opće formule XVIII,



- pri čemu
 p za 1,2 ili 3,
 n za 1,2,3,4 ili 10 stoji,
 R¹ i R², neovisni međusobno, za jedan 4-sulfobutil,
 3-sulfopropil, 2-sulfoetil, 3-metil-3-sulfopropil, metil, etil ili propilni ostatak stoji
 i
 R³ za vodik ili za jedan ostatak -COOE¹, -CONE¹E², -NHCOE¹, -NHCONHE¹, -NE¹E², -OE¹, -OSO₃E¹, -SO₃E¹,
 -SO₂NHE¹,
 pri čemu E¹ i E², međusobno neovisno, za jedan atom vodika ili za jedan metil, etil ili jedan C₃-C₆-alkilni ostatak,
 koji je od 0 do 2 atoma kisika i/ili od 0 do 1 karbonilne skupine prekinut i/ili s 0 do 5 hidroksilnih skupina
 supstituiran,
 stoji,
 stoji.
31. Cijaninske boje opće formule XIX ili XX



pri čemu

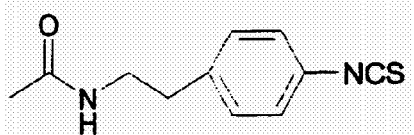
n za 2 ili 3

R^1 i R^2 , međusobno neovisno, jedan 4-sulfobutil, 3-sulfopropil ili 2-sulfoetilni ostatak predstavljaju, R^3 za jednu -COOH-skupinu ili jedan od slijedećih ostataka stoji:

-CONH-(CH₂)_n-COOH sa n=2 ili 3,

-CONH-(CH₂)_n-NCS sa n=2 ili 3,

-CONH-(CH₂)_n-NHCO-CH₂-X¹ sa n=2 ili 3, i X¹ = Cl, Br, I



R^4 i R^5 , međusobno neovisni, za jedan atom vodika, jedan metilni ostatak ili jedan hidroksilirani alkilni ostatak, kao npr. 2-hidroksietil, 3-hidroksipropil, 2,3-dihidroksipropil, 1,3-dihidroksi-2-propil, 2,3,4-trihidroksibutil, 1,3,4-trihidroksi-2-butil, 2,3,4,5,6-pentahidroksiheksil stoje,

R^6 za jednu od slijedećih skupina stoji:

-(CH₂)_m-COOH sa m=0 do 2,

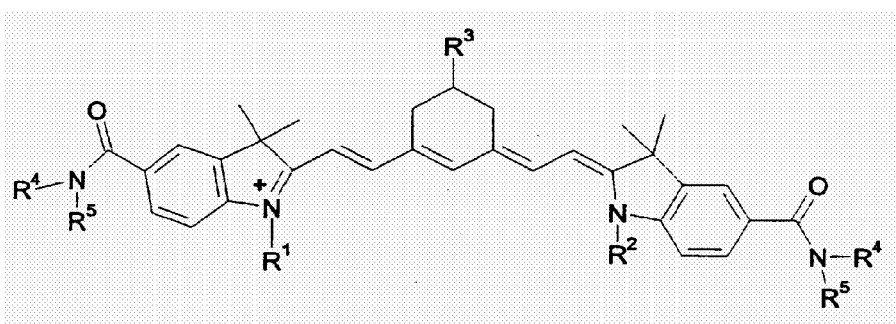
-(CH₂)_m-NCS sa m=0 do 2,

-(CH₂)_m-CONH-peptid sa m = 0 do 2,

-(CH₂)_m-NH-CS-NH-peptid sa m = 0 do 2,

i X za jedan atom kisika ili jedan atom sumpora, stoji.

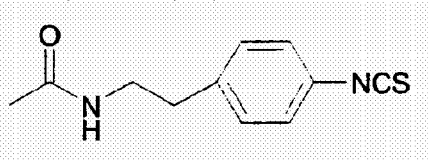
32. Cijaninske boje opće formule XXI



pri čemu

R^1 i R^2 , međusobno neovisno, jedan 4-sulfobutil ili 3-sulfopropilni ostatak predstavljaju, R^3 za jednu -COOH-skupinu ili jedan od slijedećih ostataka stoji:

- 5 -CONH-(CH₂)_n-COOH sa n=2 ili 3,
 -CONH-(CH₂)_n-NCS sa n=2 ili 3,
 -CONH-(CH₂)_n-NHCO-CH₂-X¹ sa n=2 ili 3, i X¹ = Cl, Br, I



- 10 i R₄ i R₅, neovisni međusobno, za jedan atom vodika, jedan metilni ostatak ili jedan hidroksilirani alkilni ostatak, kao npr. 2-hidroksietil, 3-hidroksipropil, 2,3-dihidroksipropil, 1,3-dihidroksi-2-propil, 2,3,4-trihidroksibutil, 1,3,4-trihidroksi-2-butyl, 2,3,4,5,6-pentahidroksiheksil, stoje.
33. Analoga VIP-a, naznačeni preko slijedećih sekvenci:

His-Trp-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-
 Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn
 (SEQ ID NO: 1)

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Phe-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-
 Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn
 (SEQ ID NO: 2)

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Lys-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-
 Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn
 (SEQ ID NO: 3)

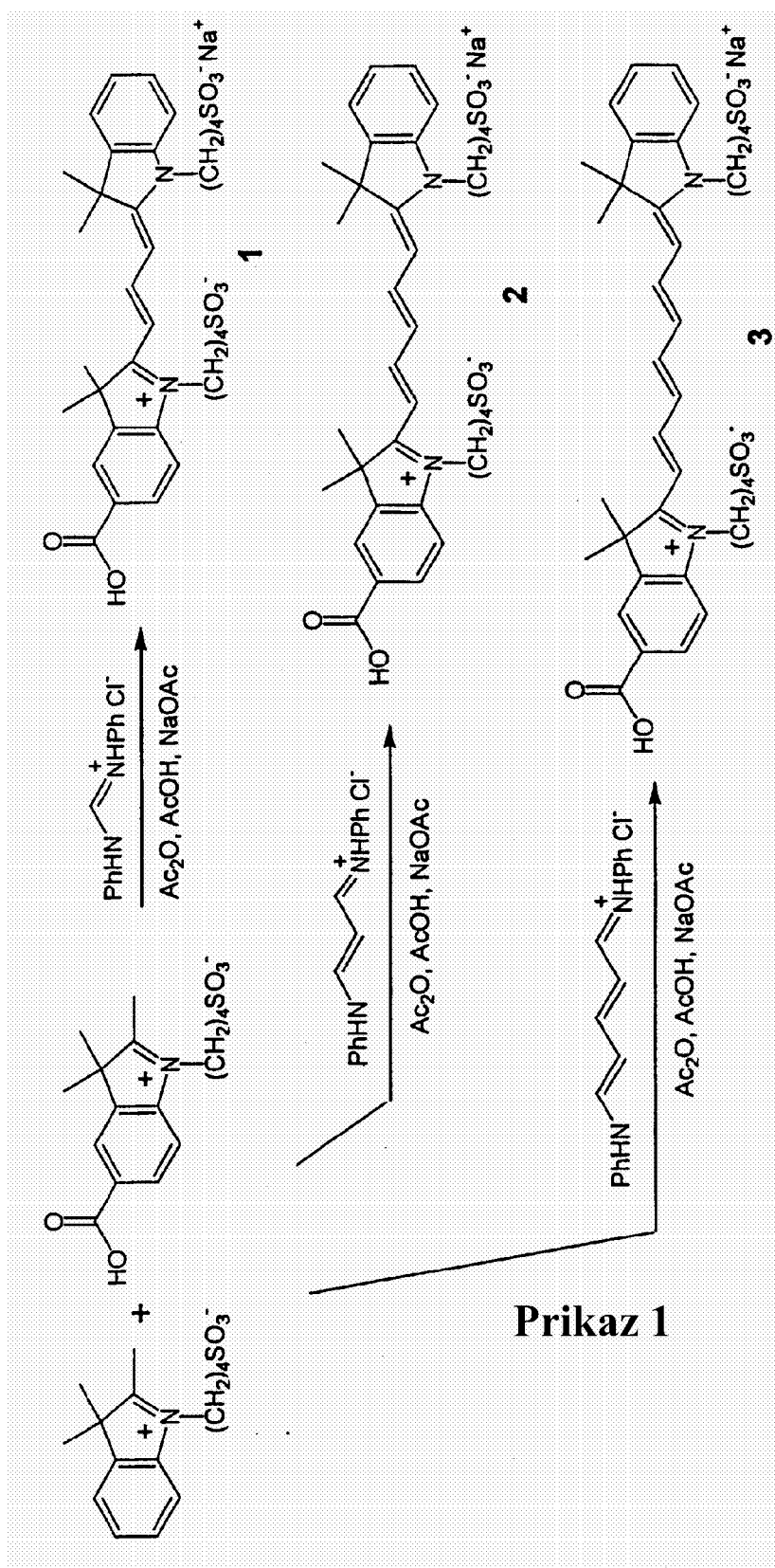
His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Gln-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-
 Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn
 (SEQ ID NO: 4)

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Arg-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-
 Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn
 (SEQ ID NO: 5)

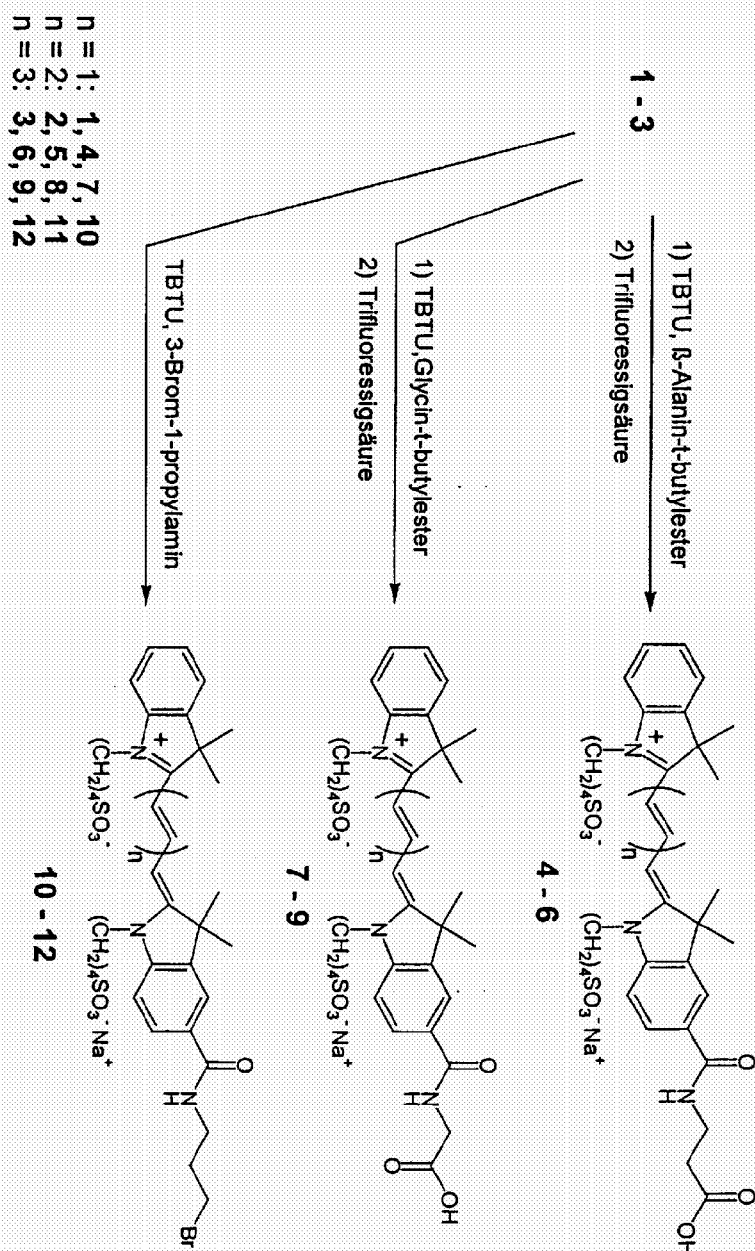
His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Trp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-
 Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn
 (SEQ ID NO: 6)

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Arg-Arg-Leu-Arg-
 Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn
 (SEQ ID NO: 7)

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-
 Lys-Gln-Met-Arg-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn
 (SEQ ID NO: 8).



Prikaz 2



POJAŠNENJE PRIKAZA 2 (PRIJEVODI NAZIVA SPOJEVA IZ SCHEME):

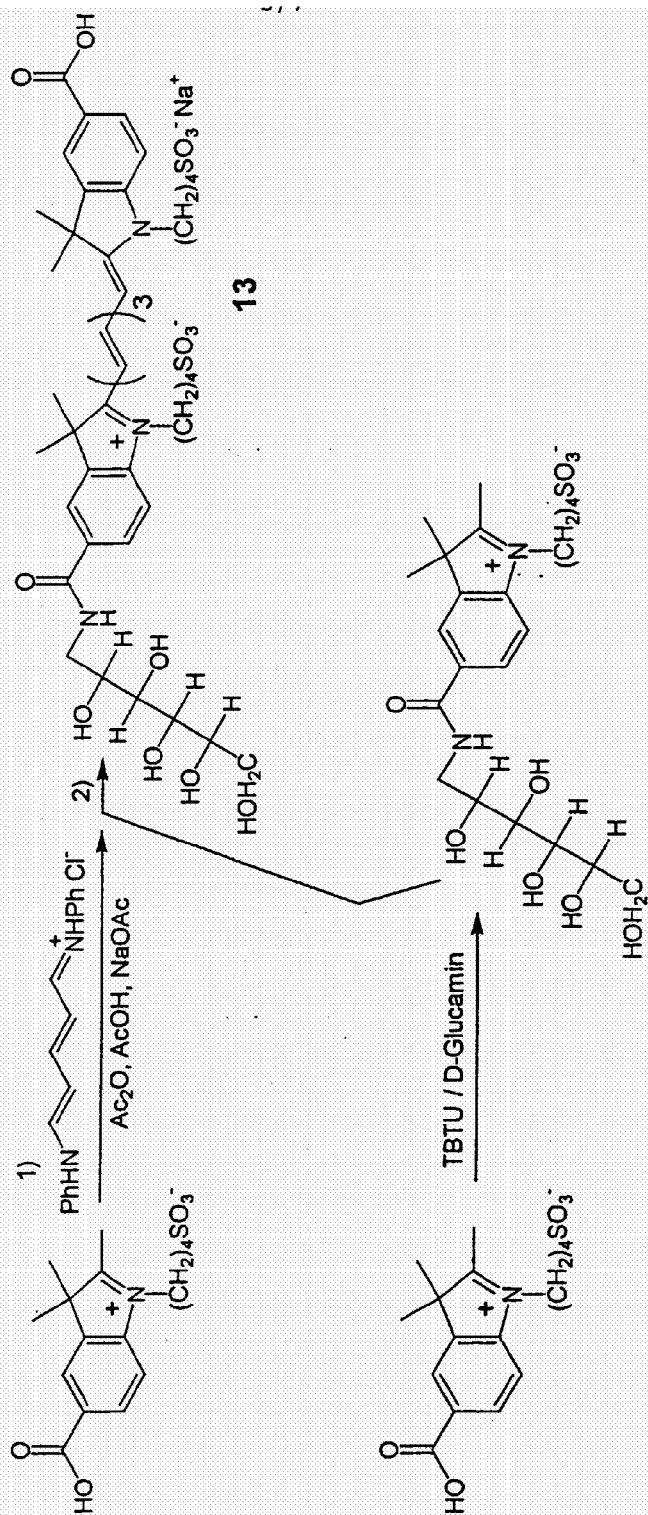
1-3

- 1) TBTU, B-ALANIN-T-BUTILESTER
- 2) TRI-FLUOR-OCTENA KISELINA

- 1) TBTU, GLICIN-T-BUTIL ESTER
- 2) TRI-FLUOR-OCTENA KISELINA

- 1) TBTU, 3-BROM-1-PROPILAMIN

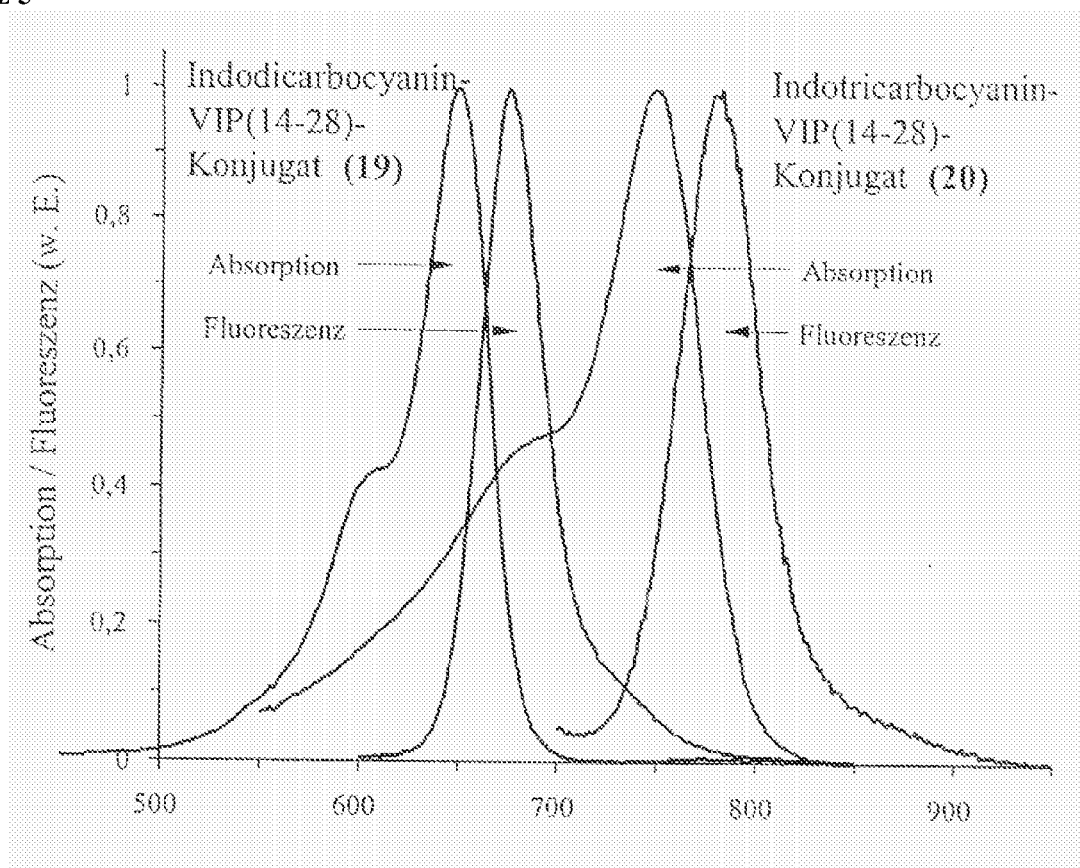
Prikaz 3



Prikaz 4

FOTO-FIZIKALNE OSOBINE KONJUGATA BOJA I PEPTIDA 14-38

Spoj	#	Apsorpc. max.	Fluoresc. max.	Koefic. ekstin.
		$\lambda_{\text{abs, max}} \text{ (nm)}$	$\lambda_{\text{em, max}} \text{ (nm)}$	$\epsilon \text{ (l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1})$
	14	556	582	98 000
	15	649	675	105 000
	16	746	781	125 000
	17	749	783	115 000
	18	556	580	108 000
	19	649	677	110 000
	20	746	781	135 000
	21	552	580	n. b.
	22	648	676	111 000
	23	746	781	n. b.
	24	746	783	n. b.
	25	747	784	121 000
	26	748	784	156 000
	27	748	784	159 000
	28	552	579	102 000
	29	648	676	111 000
	30	746	781	128 000
	31	746	781	n. b.
	32	748	782	169 000
	33	552	579	101 000
	34	648	677	121 000
	35	746	780	130 000
	36	747	781	109 000
	37	554	578	99 000
	38	648	676	121 000

Prikaz 5**POJAŠNENJE PRIKAZA 5:**

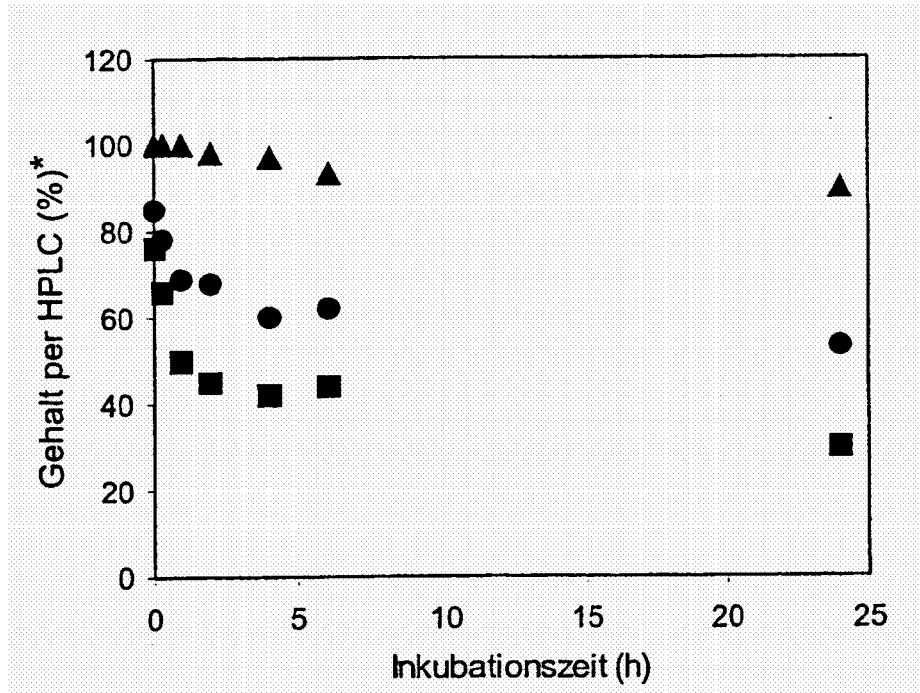
Y OS = APSORPCIJA / FLUORESCENCIJA

- 5 (19) = INDO-DI-KARBOCIJANIN-VIP(14-28)-KONJUGAT
 (20) = INDO-TRI-KARBOCIJANIN-VIP(14-28)-KONJUGAT

APSORPTION = APSORPCIJA**FLUORESZENZ = FLUORESCENCIJA**

Prikaz 6

STABILNOST KONJUGATA BOJA SA VIP-RECEPTOR-VEZUJUĆIM PEPTIDIMA U PLAZMI GOVEDA



5 GEHALT PER HPLC = SADRŽAJ PREKO HPLC-A
 INKUBATIONSZEIT = VRIJEME INKUBACIJE

▲ = INDO-TRI-KARBOCIJANIN-D-VIP(14-24)-KONJUGAT (PRIMJER 25)
 ● = INDO-TRI-KARBOCIJANIN-VIP(14-28)-KONJUGAT (PRIMJER 20)
 10 ■ = INDO-TRI-KARBOCIJANIN-VIP(1-28)-KONJUGAT (PRIMJER 16)

* = PRI 750 NM, U ODNOSU NA KONTROLNE VRIJEDNOSTI (1 MIN 0°C)

Prikaz 7

	1A	2C	3D	4E	5F	6G	7H	8I	9K	10L	11M	12N	13P	14Q	15R	16S	17T	18V	19W	20Y	
1H	96	143	43	33	103		100	126		136			45		85			20	25	6	
2S	91	93	32	38	167		96	184	30	95	131	36		235		109	152	121	235	121	
3D	111	132	100	110	110		103	103		101	96							89	149	86	
4A	100	97	41	35	135	120		95			111			110		130		79	172	140	
5V		81	33	43	100	64		107		113	105		1		82		114	100	144	95	
6F	21	7	18	16	100	22	16	78	105	78		4	4	20	28	20	12	9			
7T		86	26	29		41		1				89	26				100	111	94		
8D	134	178	100	104	231	153	199	223	240	225	208	190			250	407	177	219	220	251	184
9N	84	174	45		151	125	104	114	102	115	145	100			117	153	114	102	89	135	117
10Y	39	81	15	17	88	18	26	36	45	90		28	20	27	39	35	36			132	100
11T	116	240	43	46	178	106	87	211	216	169	111	146	1		128	246	108	100	112	122	137
12R		91	19	23		25	12		85			16	13	13	100	26	6		90		
13L	80	113	13	17	86	23		84	79	105	80	13	14		92	37	35	16	123	87	
14R	10	113	9	25		26	27		87	89	10	23	15	15	100	24	26			27	
15K		192	17	23	108	17		87	109	104	92	1	15		138	10			81	90	
16Q	100	154	19	41	94	29		108	105	115	108		21	100	150		84	120	174	107	
17M	78	123	31	24	106	15		118	91	111	180	90	18	141	118				126	87	
18A	100	137	21	42	133	42		92	159	115	122	82	25	104	172	78		99	137	95	
19V	110	149	12	15	80	26	22	105	26	104		19	18	16	20	23	20	100	91		
20K		132	12	29	83	31	42		100	78		27	12	44	121	25	27	26	88		
21K		104	29	45	105	22	46	31	100			20	11	15	94	11	46		117		
22Y	19	83	8	10	97	15	21	10	24		35	14	13	16	42	17	16	6	115	100	
23L	17	43	10	13	42	14	17		22	100	23	15	18	20	26	13	14	21		29	
24N	111	160	15	21	95	26		125		79	136	100	27	85	80	95		141	191	15	
25S		134	40	37	85	2		80	89		83	92	24		116	100		104	145	108	
26I	25	46	9	12		13	21	108	1	119		15	8	24		112	10	85	115	122	
27L	65		23	18	124		34	109	36	100		34	13	11	21	36	42		93	80	
28N		104	15	27	88	81	25	25		82	100	17	19	12	22	24	60	11	108	32	
	1A	2C	3D	4E	5F	6G	7H	8I	9K	10L	11M	12N	13P	14Q	15R	16S	17T	18V	19W	20Y	

5 SAŽETAK

Izum se odnosi na spojeve za tumorsku dijagnostiku, koji se sastoje od konjugata boja sa kratkolančanim peptidima, koji su izvedeni od vazoaktivnog intestinalnog peptida, od somatostatina ili od neuroenzina, primjene tih spojeva kao optičkih dijagnostika i istih spojeva koji sadrže dijagnostička sredstva.

LISTA SEKVENCI

OPĆE INFORMACIJE:

- 5 Podnositelj zahtjeva:
 (A) IME: Institut für Diagnostikforschung GMBH
 an der freien Universität Berlin
 ULICA: Spandauer Damm 130
 GRAD: Berlin
- 10 (E) ZEMLJA: Njemačka
 BROJ POŠTE (ZIP): D-14050
 TELEFON: (030)-30390412
 TELEFAX: (030)-30390499
- 15 NASLOV PRIJAVKA: Kratkolančani konjugati peptida i boja kao kontrastna sredstva u optičkoj dijagnostici

BROJ SEKVENCI: 8

- KOMP. ČITLJIVI OBLIK:
 20 MEDIJSKI OBLIK: Floppy disk
 KOMPJUTOR: IBM PC kompatibilan
 OPERATIVNI SUSTAV: PC-DOS/MS-DOS
 SOFTVER: Patentin Release #1.0, Verzija #1.25 (EPO)

- 25 (v) SADAŠNJI APLICIRANI PODACI:
 APLIKACIJSKI BROJ:
 (vi) STARIJI APLICIRANI PODACI
 APLIKACIJSKI BROJ
 REGISTRIRANI PODACI

- 30 (2) INFORMACIJE O SEQ ID BR.: 1

- (i) KARAKTERISTIKE SEKVENCI:
 DUŽINA: 28 amino kiselina
 35 TIP: peptidi
 LANČANOST: pojedinačni
 TOPOLOGIJA:

- (ii) TIP MOLEKULA: peptidi

- 40 (iii) HIPETETSKE: NE

(iv) ORIGINALNI IZVOR: sintetičke

- 45 (xi) OPIS SEKVENCE: SEQ ID BR: 1

His-Trp-Asp-Ala-Val-Phe-Trp-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile
 -Leu-Asn

- 50 (3) INFORMACIJA ZA SEQ ID NO: 2

- (i) KARAKTERISTIKE SEKVENCI:
 DUŽINA: 28 amino kiselina
 TIP: peptidi
 55 LANČANOST: pojedinačni
 TOPOLOGIJA:

(ii) TIP MOLEKULA: peptidi

- 60 (iii) HIPETETSKE: NE

(iv) ORIGINALNI IZVOR: sintetičke

OPIS SEKVENCE: SEQ ID BR: 2

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Phe-Asn-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn

(4) INFORMACIJA ZA SEQ ID NO: 3

(i) KARAKTERISTIKE SEKVENCI:

DUŽINA: 28 amino kiselina

TIP: peptidi

LANČANOST: pojedinačni

TOPOLOGIJA:

(ii) TIP MOLEKULA: peptidi

(iii) HIPETETSKE: NE

(iv) ORIGINALNI IZVOR: sintetičke

OPIS SEKVENCE: SEQ ID BR: 3

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Lys-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn

(5) INFORMACIJA ZA SEQ ID NO: 4

(i) KARAKTERISTIKE SEKVENCI:

DUŽINA: 28 amino kiselina

TIP: peptidi

LANČANOST: pojedinačni

TOPOLOGIJA:

(ii) TIP MOLEKULA: peptidi

(iii) HIPETETSKE: NE

(iv) ORIGINALNI IZVOR: sintetičke

OPIS SEKVENCE: SEQ ID BR: 4

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Gln-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn

(6) INFORMACIJA ZA SEQ ID NO: 5

(i) KARAKTERISTIKE SEKVENCI:

DUŽINA: 28 amino kiselina

TIP: peptidi

LANČANOST: pojedinačni

TOPOLOGIJA:

(ii) TIP MOLEKULA: peptidi

(iii) HIPETETSKE: NE

(iv) ORIGINALNI IZVOR: sintetičke

OPIS SEKVENCE: SEQ ID BR: 5

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Arg-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile
-Leu-Asn

(7) INFORMACIJA ZA SEQ ID NO: 6

(i) KARAKTERISTIKE SEKVENCI:

DUŽINA: 28 amino kiselina

TIP: peptidi

LANČANOST: pojedinačni

TOPOLOGIJA:

(ii) TIP MOLEKULA: peptidi

(iii) HIPETETSKE: NE

(iv) ORIGINALNI IZVOR: sintetičke

OPIS SEKVENCE: SEQ ID BR: 6

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Trp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile
-Leu-Asn

(8) INFORMACIJA ZA SEQ ID NO: 7

(i) KARAKTERISTIKE SEKVENCI:

DUŽINA: 28 amino kiselina

TIP: peptidi

LANČANOST: pojedinačni

TOPOLOGIJA:

(ii) TIP MOLEKULA: peptidi

(iii) HIPETETSKE: NE

(iv) ORIGINALNI IZVOR: sintetičke

OPIS SEKVENCE: SEQ ID BR: 7

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Arg-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile
-Leu-Asn

(9) INFORMACIJA ZA SEQ ID NO: 8

(i) KARAKTERISTIKE SEKVENCI:

DUŽINA: 28 amino kiselina

TIP: peptidi

LANČANOST: pojedinačni

TOPOLOGIJA:

(ii) TIP MOLEKULA: peptidi

(iii) HIPETETSKE: NE

(iv) ORIGINALNI IZVOR: sintetičke

OPIS SEKVENCE: SEQ ID BR: 8

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Tyr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-Met-Arg-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile
-Leu-Asn