



(19) Országkód

HU



MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG

MAGYAR
SZABADALMI
HIVATAL

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

223 379 B1

(21) A bejelentés ügyszáma: P 99 03582

(22) A bejelentés napja: 1996. 11. 24.

(30) Elsőbbségi adatok:

116126 1995. 11. 24. IL

(86) Nemzetközi bejelentési szám: PCT/IL 96/00161

(87) Nemzetközi közzétételi szám: WO 97/19081

(51) Int. Cl.⁷

C 07 D 487/22

A 61 K 31/40

C 07 D 491/22

A 61 K 31/49

(40) A közzététel napja: 2000. 02. 28.

(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 2004. 06. 28.

(72) Feltalálók:

Brandis, Alexander, Rehovot (IL)
Hartwich, Gerhard, München (DE)
Salomon, Yoram, Rehovot (IL)
Scheer, Hugo, Blonhofer (DE)
Scherz, Avigdor, Rehovot (IL)

(73) Szabadalmaz:

Yeda Research and Development Co. Ltd.,
Rehovot (IL)

(74) Képviselő:

Somlai Mária, S. B. G. & K. Budapesti
Nemzetközi Szabadalmi Iroda, Budapest

(54) **Eljárás szintetikus fémszubsztituált bakterioklorofillszármazékok előállítására, a vegyületek alkalmazása és a vegyületeket tartalmazó gyógyszerkészítmények**

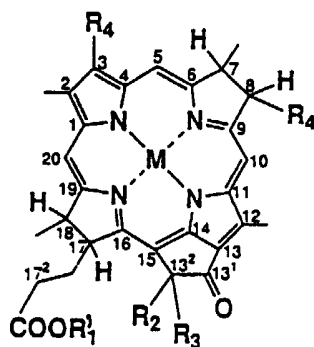
KIVONAT

A találmány tárgya eljárás (I), (II) vagy (III) általános képletű [M]-Bchl szintetikus fémszubsztituált bakterioklorofillszármazékok előállítására, ahol az általános képletekben

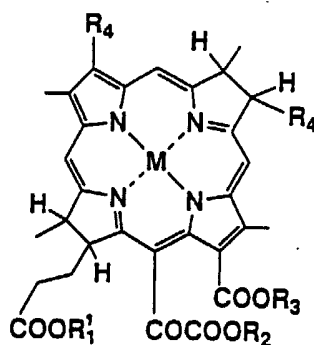
M jelentése a Cd ($r \approx 95$ pm)-nél kisebb ionsugarú fématom, amely fématom az alábbiak közül választható: két vegyértékű fématom, mégpedig Pd, Co, Ni, Cu, Zn vagy Mn,

három vegyértékű fématom, mégpedig Fe, Mn vagy Cr, vagy

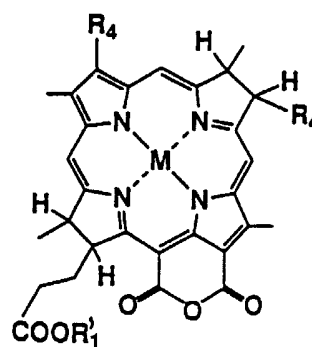
négy vegyértékű fématom, mégpedig Sn vagy Pt,
 R_1 jelentése 1–25 szénatomos szénhidrogéncsoport,
 R_2 jelentése hidrogénatom, hidroxilcsoport vagy –COOR₅ általános képletű csoport, ahol R_5 jelentése 1–12 szénatomos alkilcsoport vagy 3–12 szénatomos cikloalkilcsoport;



(I')



(II')



(III')

R₃ jelentése hidrogénatom, hidroxilcsoport vagy 1–12 szénatomos alkilcsoport, vagy 1–12 szénatomos alkoxycsoport;

R₄ jelentése egymástól függetlenül vinilcsoport, etilcsoport, acetilcsoport, 1-hidroxi-etil-csoport és éterek, valamint észterek;

mely eljárás során

(i) valamely, a fenti BChl képletnek megfelelő, dimetilformamidban feloldott bakteriofenofitinszármazékot argonatmoszférában dehidratált Cd-acetáttal reagáltatják, és a [Cd]-BChl komplexet a reakcióelegyből kromatográfia segítségével, redukáló reakciókörülmények között izolálják;

(ii) a száraz acetonban feloldott és az (i) lépésben nyert [Cd]-BChl komplexet egy megfelelő dehidratált fémsóreagenssel, amely lehet fém(M)-klorid, -acetát és -acetil-acetonát, reagáltatják argonatmoszférában; és
(iii) a kívánt fémszubsztituált [M]-BChl-származékot a reakcióelegyből kinyerik.

A találmány tárgya továbbá a fenti vegyületeket tartalmazó gyógyszerkészítmények, valamint eljárás az (I'), (II') vagy (III') általános képletű fémszubsztituált bakterioklorofillszármazékok előállítására az (I), (II) és (III) képletű vegyületek átszterezésével.

A találmány tárgya

A találmány tárgya új eljárás (I), (II) és (III) képletű fémszubsztituált bakterioklorofillszármazékok előállítására, valamint ezeket a vegyületeket hatóanyagként tartalmazó gyógyszerkészítmények, amelyek in vivo fotodinamikus terápiában (PDT), valamint diagnosztikumként és in vitro mikroorganizmusok és vírusok fotodinamikus elpusztító anyagaként alkalmazhatók.

Meghatározások és rövidítések

BChl=bakterioklorofill-a [Mg-tartalmú (I) általános képletű 7,8,17,18-tetrahidroporfirin, ahol az általános képletben M jelentése Mg, R₁ jelentése fitilcsoport vagy geranil-geranil-csoport, R₂ jelentése COOCH₃-csoport, R₃ jelentése hidrogénatom, a 3-as helyzetben található R₄ jelentése acetilcsoport és a 8-as helyzetben található R₄ jelentése etilcsoport].

BChl-származék=BChl-származék, amelyben a makrociklus, a központi fématom és/vagy a perifériás rész módosított, és amely lehet az (I), (II) és (III) általános képletű származék, valamint az (I'), (II'), (III') általános képletű származék, amelyeket az alábbiakban ismertetünk.

BPhe=bakteriofeofitin-a [BChl, amelyben a központi magnéziumatomot (Mg) két hidrogénatommal helyettesítjük].

Chl=klorofill [Mg-tartalmú 17,18-dihidroporfirinszármazék, amely 4-pirrolgyűrűből és egy izociklusos gyűrűből álló ciklus, amelyek egymáshoz konjugált kötésekkel kapcsolódnak, és amelyek a magnéziumatomhoz (Mg) kapcsolódnak]. A klorofill-a az (I) általános képletű később megadott vegyület, ahol az általános képletben R₁ jelentése fitilcsoport, R₂ jelentése COOCH₃-csoport, R₃ jelentése hidrogénatom, R₄ jelentése a 3-helyzetben vinilcsoport és R₄ jelentése a 8-helyzetben etilcsoport.

[M]-BChl=BChl-származék, amelyben a központi helyzetben magnéziumatomot egy M fématommal helyettesítjük, amelyet a későbbiekben adunk meg.

PDT=fotodinamikus terápia.

Phe=feofitin-a [Chl, amelyben a központi magnéziumatomot (Mg) két hidrogénatommal helyettesítjük].

A találmány háttere

A Mg-tartalmú (bakterio)klorofillek [(B)Chl] és ezek szabad bázisformái a (bakterio)feofitinek [(B)Phe]

a fotoszintézisben alapvető szerepet játszanak. Ezek a reakciócentrumon belül antennaként vagy redoxpigmentként fejtik ki hatásukat, és lehetővé teszik a fény által indukált töltés kialakulását. Ezen túlmenően alkalmas fotoérzékenyítő (fotoszenzibilizáló) anyagok is lehetnek, például a fotodinamikus tumorterápiában.

A porfirinekről kimutatták, hogy ezek a besugárzás során a tumorszövetben akkumulálódnak, és a fényt in situ abszorbeálják. Így ezek a vegyületek eszközül szolgálnak a tumorok helyzetének meghatározására úgy, hogy a fluoreszcencia helyzetét jelzik. A hematoporfirin nyersszármazéka a hematoporfirinszármazék vagy a HPD, amelyről leírták, hogy alkalmazható detektálás céljára, valamint tumorok fotodinamikus terápiájában. A HPD egyik formája hatékonyabb, és ez a forma olyan HPD-részt tartalmaz, amelynek aggregációs tömege 10 Kda feletti, és amelyet leírtak a 4,649,151 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalommal. A HPD-vegyületet, illetve ennek aktív komponenseit leírták a 4,753,958 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalommal, ezeket bőrbetegségek topikális kezelésében történő alkalmazásra írták le, továbbá leírták a Matthews és munkatársai, 1988, közleményükben. A vegyületekről leírták, hogy alkalmasak fertőző szervezeteket, mint például baktériumokat és vírust tartalmazó biológiai minták sterilizálására.

Abból a célból, hogy a porfirintartalmú hatóanyagok hatásosságát a terápiában javítsák, továbbá jobb diagnosztikumot állítsanak elő, számos porfirinszármazék alkalmazását javasolták, olyan származékokat, amelyekben például egy központi fématom található, amely komplex kötéssel kötődik négy pirrolgyűrűhöz és/vagy a pirrolgyűrűk periférikus szubsztituensei módosítottak és/vagy a makrociklus dihidrogénezett és így Chl-származékokká (klorinokká) alakított, vagy tetrahidrogénezett és így BChl-származékokká (bakterioklorinokká) alakított.

A magnéziumtól (Mg) eltérő fémet tartalmazó ciklusos tetrapirrolkomplexeket vizsgálták, amennyiben a porfirinben és a 17,18-dihidroporfirineknél, illetve származékaikban a fémet más fémmel helyettesítették, abból a célból, hogy meghatározzák spektroszkópiai és redoxjellemzőiket (Hynninen, 1991). A bakteriokloro-

fillek a klorofillekkel összehasonlítva előnyös vegyületek, mivel ezek erős közeli-infravörös elnyelést mutatnak, azaz jelentősen nagyobb hullámhosszoknál mutatnak jeleket, mint a klorofillszármazékok. Jelenleg azonban igen kevés adat áll rendelkezésünkre a bakterioklorofilokról, amelyek a Mg központi atomtól eltérő központi fématomot tartalmaznak.

Dougherty a WO 90/12573 számú PCT szabadalomban leírta a bakterioklorofil-a vagy -b vegyületet vagy a megfelelő bakterioklorinokat, amelyek nem tartalmaznak központi fématomot, vagy amelyekben a központi fématom egy nem paramágneses fém, amely lehet Mg^{2+} , Sn^{2+} és Zn^{2+} , továbbá a C-17³-karboxilcsoport valamely telített vagy telítetlen 8–25 szénatomos szénhidrogén-maradékkal észterezett, és így egy készítményt írt le, amely olyan eljárásban alkalmazható, amelyben egy nemkívánatos biológiai szubsztrát lebontása vagy sérülése érhető el. Az eljárás során a szubsztrátot hatásos mennyiségű fenti származék alkalmazásával fotoszenzibilizálják, majd a célszubsztrátot besugározzák olyan hullámhosszúságú fénnel, amelyet a fenti származék elegendő ideig elnyel (abszorbeál), amely idő elegendő a szubsztrát lebontásához vagy károsításához. Ezen túlmenően a vegyületekről leírták, hogy alkalmasak fotodinamikus terápiában történő felhasználásra, valamint diagnosztikumként történő felhasználásra. Megjegyzendő, hogy ugyan leírták az Sn^{2+} és a Zn^{2+} bakterioklorofil-a vagy -b komplexeket, ezek a fémszármazékok a példákban nem szerepelnek, illetve ezek előállításának példáit sem írták le a WO 90/12573 számú fenti szabadalomban.

Losev és munkatársai, 1990, közleményükben leírták a [Pd]-BChl, valamint a [Cu]-BChl komplexek előállítási eljárását, amelyeket úgy állíthatunk elő sorrendben, hogy BPhe-vegyületet Pd-benzonitrillel benzol oldószerben nitrogénáramban reagáltatunk, vagy $CuCl_2$ metanolos koncentrált oldatával reagáltatunk. A közleményben azonban az előállítási eljárás részleteit nem írták le, valamint a fémkomplexek jellemzését sem ismertették. Ezen túlmenően nem sikerült kísérleteinkben reprodukálni a Losev által leírt [Pd]-BChl komplex előállítási eljárását.

Normális körülmények között, azaz oxigén jelenlétében szobahőmérsékleten és normális fényviszonyok mellett a BChl-egységek labilisak, és például a hematóporfirinszármazékkal (HPD) összehasonlítva valamivel alacsonyabb kvantumhozammal rendelkeznek a triplett állapot képzésében. Azonban a biológiai redoxreakciók lehetséges iniciálása az előnyös spektrális jellemzők, valamint in vivo könnyű lebonthatóságuk miatt a bakterioklorofillek potenciálisan előnyösebbek, mint egyéb vegyületek, például a porfirinek és a klorofillek, a PDT-terápiában történő alkalmazásban, valamint diagnosztikumként, valamint sejtek, vírusok és baktériumok mintákban és élő szövetekben történő elpusztításában. A bakterioklorofillek kémiai módosítása esetén várhatóan jellemzőik tovább javulnak, azonban ez a javíthatóság limitált, mivel az ilyen módosított bakterioklorofillek alkalmas előállítási eljárása nem ismert (Hynninen, 1991).

A 0584552 számú közzétett európai szabadalmi leírás ismerteti a Chl és a BChl aminosavakkal képzett új konjugált vegyületeit a peptidokkal és proteinekkel képzett új konjugáltjait, amelyeket PDP-terápiában és diagnosztikumként alkalmazhatunk. Az aminosav-, a peptid- vagy a proteinmaradék közvetlenül kapcsolódik a molekulához, vagy egy távtartó csoporton keresztül kapcsolódik a Chl- vagy BChl-molekula C-17³-karboxilcsoportjához. Ezek a konjugátumok olyan enyhe reakciókörülmények között állíthatók elő, hogy a savra érzékeny központi magnéziumatom a molekulában marad. A szabadalomban leírták továbbá a klorofil-a-17³-szerin-metil-észter Zn- és Cu-komplexeit, azonban nem írtak le bakterioklorofil-fémszármazékokat, valamint az előállítási eljárásokat sem ismertették.

A DE 4121876 számú németországi szabadalom ismerteti bakterioklorofillszármazékokat, amelyekben C-13²- és C-17³-helyzetekben módosított észtereket állítottak elő enyhe reakciókörülmények között nagy reakciósebességű alkalikus átészterezés segítségével. Ez lehetővé tett más változtatásokat az izociklusos gyűrűben, miközben a központi magnéziumatom a rendszerben marad. Ezzel az átalakítással a pigmens abszorpciója 800 nm feletti értékre tolható el. A szabadalomban továbbá megemlítték a BChl-származékok Zn- és Ni-fémekkel képzett komplexeit, azonban ezeket a példákban nem ismertették, és nem ismertették ezek előállítási eljárását sem.

Kíváncsún lenne BChl-fémkomplexek előállítása, amely új komplexek PDT-terápiában alkalmazhatók úgy, hogy a BChl-vegyületek előnyös optikai és fiziológiai jellemzőit fenntartsuk, ugyanakkor fotoszenzibilizáló hatásosságukat optimalizáljuk, valamint kémiai stabilitásukat javítsuk, és fiziológiai élettartamukat optimalizáljuk. A transzmetallálás jelentős változásokat eredményez a BChl-molekulák kémiai reaktivitásában és stabilitásában. Ezek a változások jelentős szerepet játszanak a makrociklus új módosításaiban, illetve a perifériás szubsztituensek módosításaiban, és különösen javítják és optimalizálják ezek átvitelét, a szubsztráthoz való kötődését, illetve biológiai élettartamát, valamint minimálisra csökkentik a toxikus mellékhatásokat. A transzmetallálás továbbá jelentős változást eredményez a gerjesztett állapot jellemzőiben, beleértve a triplett hozamot, illetve az élettartamot, a magasabb gerjesztett állapotok elérhetőségét, illetve a citotoxikus oxigénrézecskek képzését.

Számos eljárást leírtak a porfirinekben a központi fématom változtatására (Bucher, 1975). A porfirinek könnyen rendelkezésre állnak és kémiaiilag stabilak, azonban spektrális és fiziológiai jellemzőik nem előnyösek.

Kevés eljárás ismert a klorofillek közvetlen vagy közvetett metallálására. Strell és Urumow, 1977 közleményükben leírtak [Cr]-Chl és [Mn]-Chl komplexeket, amelyeket úgy állítottak elő, hogy [Cd]-Chl komplexet (amelyet fémmentesített Chl-származékból kadmium-acetát, metanol vagy piridin oldószerben készült oldatával történő reakciójával állítottak elő) Cr^{+++} - vagy Mn^{++} -acetát metanolban készült oldatával, nitrogénatmoszférában reagáltattak. A fenti transzmetallálási eljárás alkalmazha-

tó továbbá Cu-, Zn-, Co- és Pb-komplexek előállítására klorofillszármazékok esetében, azonban nem alkalmas Fe^{3+} -, Ni- és Mg-komplexek előállítására. Azonban mivel a Cu-, Zn-, Co- és Pb-komplexek közvetlen Phe-metallálással is előállíthatók, ez az eljárás előnyösen csak a Cr- és a Mn-komplexek előállításában alkalmazható. A szerzők továbbá leírták a [Mg]-Chl komplex előállítási eljárását Phe közvetlen metallálásával acetone oldószerben, amely metallálást magnézium-acetát dimetil-szulfidban készült elegyével végeztek.

A szakirodalomban kevés adat áll rendelkezésre olyan bakterioklorofilokról, amelyek központi fém-atomként Mg-tól eltérő fématomot tartalmaznak. A bakterioklorofilok metallálása a szakirodalom szerint nehezebb, mint a klorofilok metallálása, mivel ezek kisebb reaktivitást mutatnak a metallálási reakcióban, és reaktivitásuk a mellékreakciókban a klorofilokénál magasabb. A bakteriopheofitinbe történő Mg-bevezetési eljárást írtak le a Wasielewsky, 1977 közleményben. Kísérleteink során megpróbáltunk a Strell és Urumow által leírt klorofillszármazék transzmetallálási és közvetlen metallálási eljárásaival, és így bakterioklorofillszármazékok fémkomplexeit kívántuk előállítani, azonban kísérleteink sikertelenek voltak. A bakteriopheofitinszármazékok közvetlen metallálására végzett kísérleteink semmilyen fém esetében nem voltak sikeresek, kivéve a Cu és a Zn esetét. A reakcióban el nem reagált bakteriopheofitin és metallált oxidációs termékek keveréke keletkezett, amely utóbbiak 3-acetil-klorofill-a típusú anyagok.

A találmány összefoglalása

Vizsgálataink során azt találtuk, hogy bakterioklorofillszármazékok fémkomplexeit előállíthatjuk úgy, hogy módosítjuk a Strell és Urumow által közzétett transzmetallálási eljárást, amelyben klorofillszármazékokat metallálnak, úgy, hogy megfelelő fémsókat és oldószereket alkalmazunk.

A találmány tárgya tehát új eljárás (I), (II) vagy (III) általános képletű [M]-BChl szintetikus fémszubsztituált bakterioklorofillszármazékok előállítására, ahol az általános képletekben

M jelentése a Cd ($r \approx 95$ pm)-nál kisebb ionsugarú fématom, amely fématom az alábbiak közül választható:

két vegyértékű fématom, mégpedig Pd, Co, Ni, Cu, Zn vagy Mn,

három vegyértékű fématom, mégpedig Fe, Mn vagy Cr, vagy

négyszeres vegyértékű fématom, mégpedig Sn vagy Pt,

R₁ jelentése 1–25 szénatomos szénhidrogéncsoport,

R₂ jelentése hidrogénatom, hidroxilcsoport vagy –COOR₅ általános képletű csoport, ahol R₅ jelentése 1–12 szénatomos alkilcsoport vagy 3–12 szénatomos cikloalkilcsoport;

R₃ jelentése hidrogénatom, hidroxilcsoport vagy 1–12 szénatomos alkilcsoport, vagy 1–12 szénatomos alkoxycsoport;

R₄ jelentése egymástól függetlenül vinilcsoport, etilcsoport, acetylcsoporthoz, 1-hidroxi-etil-csoport és éterek, valamint észterek.

A találmány szerinti eljárás során

(i) valamely, a fenti BChl képletnek megfelelő, dimetil-formamidban feloldott bakteriofenofitinszármazékot argonatmoszférában dehidratált Cd-acetáttal reagáltatunk, és a [Cd]-BChl komplexet a reakcióelegyből kromatográfia segítségével, redukáló reakciókörülmények között izoláljuk;

(ii) a száraz acetoneban feloldott és az (i) lépésben nyert [Cd]-BChl komplexet egy megfelelő dehidratált fémsó-reagenssel, amely lehet fém(M)-klorid, -acetát és -acetyl-acetonát, reagáltatjuk argonatmoszférában; és

(iii) a kívánt fémszubsztituált [M]-BChl-származékot a reakcióelegyből kinyerjük.

Az (I), (II) és (III) általános képletű fenti [M]-BChl-származékokból további származékokat állíthatunk elő úgy, hogy ezeket a 173-helyzetben átészterezési reakcióban reagáltatjuk, így a találmány további tárgya eljárás az (I'), (II') és (III') általános képletű vegyületek előállítására, ahol az általános képletekben

R'₁ jelentése az alábbi csoportokból választható:

(i) 1–25 szénatomos szénhidrogéncsoport, amely kívánt esetben halogénatom, oxocsoport, hidroxilcsoport, –CHO-csoport, karboxilcsoport vagy aminocsoport szubsztituenszt tartalmazhat, vagy ugyanilyen csoport, amelyet egy vagy több heteroatom szakít meg, amely lehet oxigénatom, kénatom vagy –NH-csoport, illetve a megszakítócsoporthoz lehet fenilcsoport is;

(ii) valamely aminosav- vagy peptidcsoport, amely egy hidroxilcsoportot tartalmaz, vagy ezek származéka, amely lehet C₁₋₄ alkil-észter vagy N-védett származék, ahol az N-védőcsoport terc-butoxi-, karbobenzil-oxi- vagy tritilcsoport, és ahol a hidroxilezett aminosav vagy ennek származéka a –COO-csoporttal hidroxilcsoporton keresztül kapcsolódik;

(iii) a (ii) pontban megadott peptidcsoport, amely –COO-csoporttal egy 1–25 szénatomos szénhidrogéncsoporton keresztül kapcsolódik, amely kívánt esetben halogénatom, oxocsoport, hidroxilcsoport, formilcsoport, karboxilcsoport vagy aminocsoport szubsztituenszt tartalmazhat, vagy ugyanilyen csoport, amelyet egy vagy több heteroatom szakít meg, ahol a heteroatom lehet oxigénatom, kénatom vagy –NH-csoport, vagy a megszakítócsoporthoz fenilcsoport is lehet, továbbá egy vég-funkciócsoporthoz szubsztituált, amely lehet hidroxilcsoport, karboxilcsoport vagy aminocsoport; és

(iv) egy sejt-specifikus ligandumszubsztituált, amely lehet peptidcsoport és proteincsoport, amely közvetlenül kapcsolódik a –COO-csoporttal egy 1–25 szénatomos szénhidrogéncsoporton keresztül kapcsolódik, mely kívánt esetben halogénatom, oxocsoport, hidroxilcsoport, formilcsoport, karboxilcsoport vagy aminocsoport szubsztituenszt tartalmazhat, vagy egy vagy több heteroatommal megszakított, ahol a heteroatomok lehetnek oxigénatom, kénatom vagy –NH-csoport, vagy fenilcsoport megszakítócsoporthoz is

tartalmazhat, továbbá egy végcsoport funkciós csoport szubsztituenszt tartalmaz, amely lehet hidroxilcsoport, karboxilcsoport vagy aminocsoport;

- R_2 jelentése hidrogénatom, hidroxilcsoport vagy $-COOR_5$ általános képletű csoport, ahol R_5 jelentése 1–12 szénatomos alkilcsoport vagy 3–12 szénatomos cikloalkilcsoport,
- R_3 jelentése hidrogénatom, hidroxilcsoport vagy 1–12 szénatomos alkilcsoport, vagy 1–12 szénatomos alkoxycsoport;
- R_4 mindegyikének jelentése egymástól függetlenül vinilcsoport, etilcsoport, acetylcsoprt, 1-hidroxi-etilcsoport és ezek étere, valamint észtere; és
- M jelentése fématom, amelynek ionsugara kisebb, mint a Cd ($r \approx 95$ pm) ionrádiusza, és az M fém lehet két vegyértékű fématom, mégpedig lehet Pd, Co, Ni, Cu, Zn és Mn, három vegyértékű fématom, mégpedig Fe, Mn és Cr, valamint négy vegyértékű fématom, mégpedig Sn és Pt,

oly módon, hogy

(i) az (I), (II) vagy (III) általános képletű bakterio-klorofillszármazékból leszármaztatott bakteriofeofitint, amely a 17³-helyzetben $-COOR_1$ általános képletű csoportot tartalmaz, ahol R_1 jelentése 1–25 szénatomos szénhidrogén-csoport, dimetil-formamidban oldunk, majd az elegyet argonatmoszférában dehidratált Cd-acetáttal reagáltatjuk, és a reakcióelegyből redukáló reakciókörülmények között a nyert [Cd]-BChl komplexet kromatográfia segítségével izoláljuk;

(ii) az így előállított [Cd]-BChl komplexet száraz acetonban oldjuk, és megfelelő dehidratált fém(M)-sóval, amely lehet fém(M)-klorid, -acetát és -acetyl-acetonát, argonatmoszférában reagáltatjuk; és

(iii) a kapott metallált [M]-BChl-származékot a reakcióelegyből R'_1-OH -reagens segítségével átészterezési reakciókörülmények között kinyerjük, és így az (I'), (II') vagy (III') általános képletű vegyületeket nyerjük, ahol R'_1 jelentése az általános képletre a fent megadott.

A találmány egy előnyös változata szerint az eljárásban olyan [M]-BChl-származékot alkalmazunk, melynél R_1 jelentése fitilcsoport vagy geranil-geranil-csoport, R_2 jelentése $COOCH_3$ -csoport, R_3 jelentése hidrogénatom, R_4 jelentése a 3-helyzetben acetylcsoprt és a 8-helyzetben etilcsoport, valamint M fématom jelentése Pd, Cu, Ni, Co, Zn és Mn. Más előnyös eljárás során olyan vegyületet alkalmazunk, amelyben M-sóként a (ii) reakciólépésben valamely fém-kloridot alkalmazunk.

A találmány egy további változata olyan eljárásra vonatkozik, amelyben az (i) reakciólépést és a (ii) reakciólépést egy lépésben kombináljuk, azaz a feleslegben alkalmazott bakteriofeofitinszármazékot megfelelő dehidratált M-sóval, például fém-kloriddal reagáltatjuk katalitikus mennyiségű dehidratált Cd-só, például Cd-acetát jelenlétében, és a reakciót dimetil-formamidban vagy acetonban hajtjuk végre.

A találmány egy más változata szerint az (I'), (II') és (III') általános képletű fent megadott bakterio-klorofillszármazékokat úgy állítjuk elő, hogy olyan (I) általá-

nos képletű vegyületet, ahol az általános képletben R_2 jelentése $COOCH_3$ -csoport, R_3 jelentése hidrogénatom, R_4 jelentése a 3-helyzetben acetylcsoprt és a 8-helyzetben etilcsoport, valamint R_4 jelentése fitilcsoport vagy etilcsoport és M jelentése Pd vagy R_1 jelentése fitilcsoport és M jelentése Cu, nem alkalmazhatunk.

Az (I'), (II') és (III') fent megadott általános képletű metallobakterio-klorofillszármazékok alkalmazhatók fotoszenzibilizálószerként terápiás hatóanyagként és diagnosztikumként, valamint mintákban és élő szövetekben, sejtek, vírusok és baktériumok elpusztítására, továbbá a szakirodalomban ismertek HPD-terápia alkalmazásában történő felhasználásra, valamint egyéb fotoszenzibilizáló anyagként történő felhasználásra.

Az ábrák rövid leírása

Az 1. ábra a [Pd]-BChl-17³-szeril-metil-észter ([Pd]-BChl-Ser) és a BChl-17³-szeril-metil-észter (BChl-Ser) fitotoxicitásának bemutatása *S. aureus* baktérium szuszpenzióban.

A 2. ábrán bemutatjuk a [Pd]-BChl-Ser fitotoxicitását M2R melanoma-sejtenyészetekben, amelyeket [³H]-timidinbevezetéssel készítettünk.

A találmány részletes leírása

A porfirinekkal és a klorofillekkel szemben a bakterio-klorofillek közvetlen metallálása nehéz. A találmány szerinti eljárással lehetővé válik metallált bakterio-klorofillszármazékok előállítása, amelyek javított jellemzőjűek és jobban alkalmazhatók fotoszenzibilizálószerként, és ezeket úgy állítjuk elő, hogy a megfelelő [Cd]-BChl-származékokat transzmetalláljuk.

A találmány szerinti eljárásnak megfelelően a könnyen előállítható [Cd]-BChl komplexek, amelyeket acetát/dimetil-formamid eljárással állítunk elő, kiváló termeléssel, enyhe reakciókörülmények között más fémkomplexekké transzmetallálhatók. A [Cd]-BChl-prekurzort alkalmazó transzmetallálási eljárás könnyen végrehajtható. Ez valószínűleg amiatt áll fent, mivel a reakcióban nagy ionsugarú (r_M) Cd^{2+} -t (95 pm) alkalmazunk a kisebb ionsugarú Mg^{2+} -ionnal szemben ($r_M=72$ pm). A reakció továbbá azért hajtható végre, mivel aceton oldószert alkalmazunk a fémion partner-ionjaival (kloridokkal) kombinálva. A transzmetallálási reakció során a redukált termékekkel egyensúlyban $CdCl_2$ és [M]-BChl keletkezik, és a $CdCl_2$ az acetonban igen alacsony oldhatóságú, így az egyensúlyt ez a termékek irányába tolja el.

A találmány szerinti egyik eljárásban olyan anyagokat alkalmazunk, ahol az általános képletben R_1 jelentése elágazó vagy egyenes szénláncú telített vagy telítetlen csoport, amely lehet aromás csoport, szénhidrogén-csoport, előnyösen 1–25 szénatomos csoport, mint például alkilcsoport, alkenilcsoport, fenilcsoport, előnyösen 1–4 szénatomos kis szénatomszámú alkilcsoport, legelőnyösebben etilcsoport vagy természetes BChl-vegyületekből leszármaztatható csoport, például geranil-geranil-(2,6-dimetil-2,6-oktadienil)-csoport vagy fitil-(2,6,10,14-tetrametil-hexadec-14-en-16-il)-csoport; és R'_1 jelentése az R_1 jelentésére megadott

vagy olyan szénhidrogéncsoport, amely halogénatom, amely lehet például fluoratom, brómatom, klóratom és jódatom vagy hidroxilcsoport, oxocsoport, formilcsoport, karboxilcsoport vagy aminocsoport szubsztituenszt tartalmazhat, vagy ilyen, kívánt esetben szubsztituált szénhidrogéncsoport, amely oxigénatommal, kénatommal vagy NH-csoporttal, előnyösen oxigénatommal megszakított, például R'₁ jelentése oligooxi-etilénlikol-csoport, amely 4–10 szénatomot tartalmaz, előnyösen pentaaxi-etilénlikol-csoport. Amennyiben peptid vagy protein esetében R'₁ jelentése távtartó csoport, ez egy vég-funkcióscsoportot tartalmaz, amely lehet hidroxilcsoport, karboxilcsoport és aminocsoport, amely vég-funkcióscsoporton keresztül a peptid vagy a protein észter- vagy amidkötéssel kapcsolódik.

A találmány szerinti másik eljárásban olyan vegyületet alkalmazunk, ahol az általános képletben R'₁ jelentése aminosavmaradék-csoport vagy peptidcsoport, amely hidroxilcsoportot tartalmaz, mint például szerin, treonin vagy tirozin vagy peptid, amely ilyen csoportokat tartalmaz, vagy ilyen aminosavszármazéka vagy peptidszármazéka, amely lehet észter, például alkil-észter és N-védett származék, ahol az N-védőcsoport lehet például terc-butoxi-csoport, karbobenzoxi-csoport vagy tritilcsoport, és ahol a hidroxilezett aminosav vagy peptid vagy ezek származéka a –COO-csoport-hoz a hidroxilcsoporton keresztül kapcsolódik. Ilyen aminosavszármazékok lehetnek például a szerin-metil-észter, az N-tritil-szerin-metil-észter, a tirozin-metil-észter és az N-terc-butoxi-tirozin-metil-észter, továbbá ilyen peptid lehet az N-karbobenzoxi-szerin-szerin-metil-észter, amelyeket az EP 0584552 számú szabadalom-ban leírt eljárásnak megfelelően állíthatunk elő. Legelőnyösebb esetben olyan [M]-BChl-származékot alkalmazunk, amely [Pd]-BChl-vegyület, amely L-szerin-metil-észterrel észterezett.

A találmány szerinti eljárásban más esetben olyan anyagot alkalmazunk, ahol az általános képletben R'₁ jelentése valamely sejtspecifikus ligandum, amely lehet peptid és protein, amely lehet nem limitáltan hormonpeptid, például melanocitastimuláló hormon (melanotropin) és antitest, például immunoglobulin és tumorspecifikus antitestek.

Az (I') általános képletű vegyületek [M]-Bchl-származékai, ahol M jelentése Zn vagy Cu, közvetlen metallálással állíthatók elő a nem metallált BChl-származékból, amely eljárást az alábbi 1–4. példákban mutatunk be.

A bakterioklorofilnek néhány fémkomplexe igen stabil, és így ezek alkalmazhatók további módosítások végrehajtására a tetrapirrol-gyűrűrendszer periferiáján, amely módosítási reakciókörülményei erős reakciókörülmények lehetnek, és a reakciókban alkalmazhatunk például ecetsavat vagy erős ásványi savat, mint például sósavat vagy kénsavat is. Így például észtereket, például kívánt esetben szubsztituált alkil- vagy aril-észtereket állíthatunk elő a hidroxilcsoportok reakciójával, amelyek például a 3¹- vagy 13²-helyzetekben találhatók. Az észterezési reakciót a megfelelő alifás vagy aromás savakkal, savkloridokkal vagy aminosavakkal haj-

hatjuk végre, továbbá étereket nyerhetünk ugyanezen helyzetekben úgy, hogy a megfelelő alifás vagy aromás alkoholokkal végzünk reakciót. A 3¹-helyzetben hidroxilcsoportot tartalmazó vegyületek például a 3-hidroxil-etil-BChl-származékok vagy a 13²-helyzetben hidroxilcsoportot tartalmazó vegyületek, például a 13²-OH-BChl-származékok, szokásos eljárásokkal állíthatók elő (lásd Struck és munkatársai, 1992, és Hynninen, 1991, közleményét). Ezen túlmenően a természetben előforduló fitil- és geranil-geranil-észterek a 17³-helyzetben savkatalízis alkalmazásával áteszterezhetők más észterekké, például etil-észterre. A reakciót a megfelelő alkohollal hajtuk végre. A makrociklusos gyűrűbe más szubsztituensek is bevezethetők Wittig-reakció segítségével, amely reakciót a természetes CO-csoportokon végzünk, például a BChl a vegyület 3-acetilcsoportján hajtuk végre, vagy ezek a csoportok kémiaiilag bevezethetők, keto-ketoalkoholok alkalmazásával, amelyek a C-17³-helyzetben észtercsoportot képeznek, valamint az OH-csoportok oxidatív kapcsolásával, amelyek a C13²-helyzetben éterkötést képeznek, vagy savkatalizált észterezéssel az OH-csoportokon, például a C-3¹-helyzetben, a C-13¹-helyzetben, a C-13²-helyzetben, amely reakciót karbonsavakkal hajtunk végre.

Más eljárásban a perifériás csoportok módosítását a tetrapirrol-gyűrűrendszerben természetes Mg-tartalmú BChl-származékon végezzük a fémmentesítés előtt.

A (II) általános képletű és (III) általános képletű BChl-származékokat a megfelelő természetesen előforduló (I) általános képletű BChl-származékokból állíthatjuk elő (lásd Struck, 1990).

A találmány szerinti vegyületeket, ahol az általános képletben R'₁ jelentése valamely aminosavmaradék-csoport, valamely peptidcsoport vagy egy proteincsoport, például antitest, a találmány szerinti transzmetallálási eljárás után végzett reakcióval állítjuk elő enzimikus áteszterezési reakcióval, amelyben klorofiláz enzimet alkalmazunk, vagy katalitikus kondenzációs reakcióval, amelyben a megfelelő bakterioklorofilidet reagáltatjuk (szabad sav BChl-17³-COOH) hidroxilezett aminosavval, peptiddel vagy proteinnel, diciklohexil-karbodiimid (DCC) és N-hidroxi-szukcinimid (NHS) vagy 4-dimetil-aminopiridin (DMAP) alkalmazásával az EP 0584552 számú szabadalomban leírtak szerint, vagy savkatalizált reakcióban reagáltatjuk, amelyet a Mg-komplexe, mint például a természetes BChl nem viselnek el.

A találmány szerinti új fémbakterioklorofil-származékok alkalmasak fotoszenzibilizálószerként terápiás és diagnosztikumcélra történő felhasználásra, valamint sejtek, vírusok és baktériumok elpusztítására mintákban és élő szövetekben, amely folyamatok a szakirodalomban a HPD-vegyületre és egyéb fotoszenzibilizáló anyagokra ismertek. Ezek a vegyületek például alkalmasak arra, hogy a daganatos sejteket vagy egyéb abnormális szöveteket szenzibilizáljanak és lebontsanak úgy, hogy ezeket vagy *in vivo* vagy *ex vivo* módon a megfelelő hullámhosszú fény alkalmazásával besugározzuk. Feltehetőleg, hogy a fotoaktiválás energiája átkerül az endogén oxigénbe és ezt szinglett oxigénné alakítja, amely szinglett oxigén felelős a citotoxikus hatásért.

Ezen túlmenően a bakterioklorofill fluoreszkáló vegyület fotoaktivált formái keletkeznek, és fluoreszcenciajelenség tapasztalható. Ez segít abban, hogy a tumorokat lokalizáljuk, illetve az olyan helyzeteket meghatározzuk, ahova a fémbakterioklorofilket adagoltuk.

A szakirodalomban ismert betegségek, amelyet az új találmány szerinti fémbakterioklorofill-származékokkal kezelhetünk, a tumorszövet lebontása szilárd tumorokban, a véredényekben a plakk oldása (lásd például a 4,512,762 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmat); a topikális betegségek kezelése, mint például az acne, az epidermaphytosis, a szemölcs, a papilloma és a psoriasis kezelése, valamint a biológiai termékek (mint például a vérátömlesztés céljára készült vér) fertőző anyagokból való mentesítése.

A találmány szerinti fémbakterioklorofill-származékokat a betegnek történő alkalmazás céljára gyógyszerkészítménnyé alakítjuk vagy in vitro alkalmazhatjuk ilyen formában, és ezt az átalakítást a szakirodalomban ismert eljárásokkal végezhetjük, például amelyeket leírtak a Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Penna. közleményben. A találmány szerinti készítmények így adagolhatók szisztémás úton, különösen injekció formájában, vagy topikális úton is alkalmazhatók.

Diagnosztikai célokra a találmány szerinti fémbakterioklorofill-származékokat önmagukban alkalmazhatjuk vagy radioizotóppal jelölt formában használhatjuk, vagy egyéb detektálóeszközöket is alkalmazhatunk, amelyek a szakirodalomban ismertek.

Az adagolandó fémbakterioklorofill-származék mennyisége a PDT-terápiában alkalmazott más porfirinek kapcsán nyert tapasztalatok alapján változhat az alkalmazott származék típusától függően, amelyet aktív hatóanyagként használunk, a kezelt betegség típusától, az adagolás útjától, a beteg korától és állapotától függően, és ezt a kezelőorvos határozza meg.

A besugárzó fény hullámhosszát előnyösen úgy választjuk meg, hogy ez a fémbakterioklorofillt fotoszenzibilizáló maximális abszorpciósérték legyen. A találmány szerinti vegyületek bármelyike esetében az alkalmas hullámhossz az abszorpcióspektrum alapján könnyen meghatározható.

Az *in vivo* felhasználáson kívül a találmány szerinti fémbakterioklorofill-származékok alkalmazhatók *in vitro* kezelésben is abból a célból, hogy a káros vírusokat vagy fertőző anyagokat, mint például káros baktériumokat, különböző anyagokban elpusztítsuk. Például a vérátömlesztésre alkalmazott vér- vagy vérplazmakészítmény a találmány szerinti vegyülettel kezelhető és besugározható, és így sterilizálható.

A találmány tárgya továbbá gyógyszerkészítmények, amelyek az (I'), (II') és (III') általános képletű fémbakterioklorofill-származékokat tartalmazzák, és fotodinamikus terápiában, valamint diagnosztikumként rossztendulátú daganatok vagy elváltozások jelzésére, illetve sejtek, baktériumok és vírusok fotodinamikus elpusztítására alkalmazhatók.

Ilyen célra a készítményeket szokásos eljárásokkal állítjuk elő és adagoljuk, amint ezt leírták például a

4,649,151 számú, a 4,753,958 számú, az 5,256,840 számú és az 5,238,940 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmakban, valamint a 0584552 számú európai szabadalomban, valamint a WO 90/12573 számú PCT szabadalomban, amelyeket referenciaként adunk meg.

A találmány szerinti eljárást és készítményt az alábbi példákon részletesen bemutatjuk. A példák nem jelentik a találmány tárgykörének korlátozását.

Példák

A példákban és az 1. táblázatban a kiindulási vegyületeket és a nyert fémkomplexekeket az alábbi vastag betűkkel jelöljük:

1a – BPhe	1b – BPhe-13 ² -OH
2a – [Pd]-BChl	2b – [Pd]-BChl-13 ² -OH
3a – [Co]-BChl	3b – [Co]-BChl-13 ² -OH
4a – [Ni]-BChl	4b – [Ni]-BChl-13 ² -OH
5a – [Cu]-BChl	5b – [Cu]-BChl-13 ² -OH
6a – [Zn]-BChl	6b – [Zn]-BChl-13 ² -OH
7a – BChl	7b – BChl-13 ² -OH
8a – [Cd]-BChl	8b – [Cd]-BChl-13 ² -OH
9a – [Mn]-BChl	9b – [Mn]-BChl-13 ² -OH

Anyagok és eljárások

(i) *BChl izolálása*: A BChl- (7a vegyület) vegyületet fotoszintetikus baktériumokból, mint például *Rhodobacter (Rb) sphaeroides* vagy *Rhodospirillum rubrum* baktériumokból izoláljuk a Scherz és Parson, 1984, Struck és munkatársai, 1992 vagy Svec, 1991, közleményekben leírt eljárásokkal. A tisztítást DEAE-Sephrose-on végezzük az Omata és Murata, 1983, közleményében leírtaknak megfelelően.

(ii) *[BChl-13²-OH] 13²-hidroxi-bakterioklorofill-a előállítás*: BChl-13²-OH- (7b vegyület) vegyületet, amely az (I) általános képletű anyag, ahol az általános képletben R₁ jelentése fitilcsoport, R₂ jelentése COOCH₃-csoport, R₃ jelentése hidroxilcsoport, R₄ jelentése a 3-helyzetben acetilcsoport és a 8-helyzetben etilcsoport, állítunk elő a BChl- (7a) vegyület hidroxilezésével a C-13²-helyzetben. A reakciót úgy végezzük, hogy a (7a) vegyületet metanolban 5–7 napon át sötétben 4 °C hőmérsékleten tároljuk (Struck és Scheer, 1990). Más eljárás szerint a LiBr-eljárást alkalmazzuk a Schaber és munkatársai, 1984, közleményében leírtaknak megfelelően, amely eljárás kevesebb mellékterméket eredményez. Mindkét esetben a tisztítást preparatív (20×20 cm²) szilikagél lemezeken (Silica gel 60 H, Merck) vagy oszlopokon végezzük toluol/aceton 9/1 térfogat/térfogat eluens alkalmazásával. A címbeli vegyületet tartalmazó zöldeskék sávot (R_F 0,4) mechanikusan eltávolítjuk, majd az el nem reagált BChl-vegyületet a SiO₂-adszorbensről acetonnal extraháljuk.

(iii) *BChl és BChl-13²-OH fémmentesítése*: BPhe- (1a vegyület) és BPhe-13²-OH- (1b vegyület) vegyületeket nyerünk a BChl- (7a) és a BChl-13²-OH- (7b) vegyületek sorrendben történő fémmentesítésével, amelyet a Rosenbach–Belkin, 1988, közleménye szerinti eljárásnak megfelelően végzünk. Ezt kis mennyiségű ecetsav reakciójával hajtjuk végre (csak a pigmens oldódik). A fémmentesítés után, amely azonnal megtörtén-

nik, az ecetsavat nitrogénárammal eltávolítjuk, és a BPhe-, valamint a BPhe-13²-OH-vegyületeket szilárd anyagként kinyerjük.

(iv) *Klorofilláz (Chlase)*: A Chlase acetontport *Melia azedarach* L. kinafalevelekből nyerjük az EP 0584552 5 számú szabadalommal leírtak szerint.

(v) *Sejttenyésztés*: M2R egér-melanomasejteket tenyésztünk egy rétegben Dulbecco módosított Eagle táptalajon/F12, amely 25 mM HEPES-, pH=7,2, 10% magzati marhaszérum-, 2 mM glutamin-, 0,06 mg/ml 10 penicillin- és 0,1 mg/ml sztreptomycin-tartalmú. Az inkubálást nedvesített 8% CO₂-tartalmú atmoszférán 37 °C hőmérsékleten végeztük a korábban leírt Gerst és munkatársai, 1986, eljárásának megfelelően.

(vi) *Sejtfototoxicitás vizsgálatok*: M2R egér-melanomasejteket (1 × 10⁵ sejt/üreg) tenyésztünk 24 üreges mikrolemezeken 24 órán át egészen kb. 2 × 10⁵ sejt/üreg mennyiség kialakulásig, amely kb. 70–80%-os egybefolyást eredményezett. Az [M]-BChl-származékot táptalajban oldottuk, majd ultrahanggal diszpergáltuk. A táptalajközegben Photosan-3 (kereskedelemben kapható HPD) anyagot végkoncentrációra hígítottunk. A táptalajt szérumentes közeggel helyettesítettük, majd a sejteket kívánt mennyiségű fotoszenzibilizátor alkalmazásával sötétben inkubáltuk. 2 óra elteltével a sejteket szobahőmérsékleten 5 percen át a lemez aljáról besugároztuk. A közeget ezután közeget tartalmazó szérummal helyettesítettük, majd a tenyésztőlemezeket 24 órára ismét az inkubátorba helyeztük. A citotoxicitás hatásosságát a sejtkultúrán (i) a sejtmorfológia mikroszkópos vizsgálatával, (ii) egy vitális festékkel való kezelés után (propidium-jodid [PID] [2,7-diamino-9-fenil-10-(diethyl-amino-propil)-fenatridinium-jodid-metil-jodid]) a sejtek fluoreszcenciamikroszkópos vizsgálatával vizsgáltuk, amely festék szelektíven akkumulálódik a sérült sejtek magjában, és (iii) [³H]-timidinbeépüléssel vizsgáltuk az alábbiak szerint. A kontrollvizsgálatokban (1) nem kezelt sejteket, amelyeket sötétben tartottunk, alkalmaztunk, (2) nem kezelt sejteket, amelyeket besugároztunk és megvilágítottunk, használtunk, és (3) hatóanyaggal kezelt, de sötétben tartott sejteket alkalmaztunk.

(vii) *Fényforrás*: A besugárzás fényforrása házilag készített 250 W halogénlámpa, amely 10 cm-es vízszűrőn át fókuszált egy üvegtartón található és folyékony szűrővel ellátott (klorofill-a O. D.=10,00, 660 nm mellett). A fény dózist minden kísérlet során 45 m W/cm² értékre állítottuk be.

(viii) *[³H]-timidinbeépítés*: A PDT-kezelést követő 20 órával a sejtenyészeteket 1 µCi/ml [³H]-timidinnel 50 pulzáltunk 2 óra időtartamon át, a pulzálást 37 °C hőmérsékleten végeztük. Ezt követően a tenyészeteket kétszer foszfátpufferelt fizioiógias sóoldattal mostuk, majd 30 percen át 4 °C hőmérsékleten 7,5%-os hideg triklór-ecetsav-oldattal kezeltük. Ezután az elegyet kétszer etanollal mostuk. Az elegyet nátrium-hidroxidot (1 n, 300 µl/üreg) adagoltunk, majd a lemezeket 10 percen át 37 °C hőmérsékleten tartottuk. 100 µl térfogatú mintákat szcintillációs ampullába vittünk, majd ezeket 100 µl 1 n HCl-oldattal semlegesítettük, és a ra-

dioaktivitást folyadékszintillációs számlálással 4 ml (20/8 térfogat/térfogat) xilol szcintillátor lumax eleggyel mértük a Chen és munkatársai, 1988, közleményében leírtak szerint.

1. példa

[Zn]-BChl és [Zn]-BChl-13²-OH előállítása közvetlen metallálással

[Zn]-BChl- (6a vegyület) és [Zn]-BChl-13²-OH- (6b vegyület) vegyületeket állítunk elő BPhe (1a) BPhe-13²-OH (1b) sorrendben végzett közvetlen metallálásával, amely metallálást acetát/ecetsav vagy acetát/dimetil-formamid eljárással végezzük.

1a. Acetát/dimetil-formamid (DMF) eljárás

[Zn]-BChl-, illetve [Zn]-BChl-13²-OH- (6a, 6b) vegyületeket állítunk elő úgy, hogy külön-külön BPhe- és BPHI-13²-OH- (1a, 1b) vegyületeket körülbelül 70 µM mennyiségben dimetil-formamidban 1000-szeres felesleg vízmentes Zn(OAc)₂ jelenlétében visszafolyatás mellett forralunk 60 (75) percen át 110 °C hőmérsékleten (a 163 °C hőmérsékleten végzett visszafolyatás melletti forrás a reakció idejét 5 percre csökkenti). A reakció előrehaladását spektroszkópia segítségével követjük, és a teljes végbemenetelig végezzük. A termékek izolálását és tisztítását a (8a), illetve (8b) vegyületek, a Cd-komplexek esetében a későbbiekben leírt eljárásnak megfelelően végezzük (termelés: kb. 80%).

1b. Acetát/ecetsav eljárás

[Zn]-BChl-, illetve [Zn]-BChl-13²-OH- (6a, 6b) vegyületeket állítunk elő (1a), (1b) vagy (7a), (7b) vegyületek visszafolyatás melletti forralásával. A forralást kb. 70 µM jégecetes oldatban végezzük, amely 250-szeres felesleg vízmentes Zn(OAc)₂-tartalmú, valamint 50 µM nátrium-aszkorbátot tartalmaz. A melegítést 120 (30) percen át 100 °C hőmérsékleten végezzük. Ezt követően az ecetsavat nitrogénáramban elpárologtatjuk, majd a Zn-komplexet dietil-éterrel extraháljuk, majd preparatív ModCol HPLC oszlopon (250 × 25,4 mm) tisztítjuk. Az oszlop Bakerbond Silica NP töltettel rendelkezik (részcseméret 10 µm; pórusátmérő: 150). A (6a) vegyületet izokratikus módon eluáljuk (10 ml/perc) 2-propanol (5%), metanol (5%) és n-hexán (90%, térfogat/térfogat) eleggyel, a retenciós idő kb. 17 perc, és ~75% termeléssel a tisztított vegyületet nyerjük. A (6b) vegyületet oszlopkromatográfia segítségével szilikagélén azonos eluens alkalmazásával, mint a HPLC kromatográfiában alkalmazott, tisztítjuk, és így 90–95% termeléssel a kívánt anyagot nyerjük.

2. példa

[Zn]-BChl-3-vinil és [Zn]-BChl-3-vinil-13²-OH előállítása közvetlen metallálással

Az 1a. fenti példa szerinti eljárásnak megfelelő acetát/DMF eljárással metallálást végzünk, és ezt más BPhe-származékokon is végrehajthatjuk úgy, hogy a reakció körülményeit enyhén megváltoztatjuk. Például a 3-vinil-BPhe vagy a 3-vinil-13²-hidroxil-BPhe metallálását Zn(OAc)₂ segítségével azonos körülmények között végezzük, és ez körülbelül 40 percen belül 120 °C hőmérsékleten megtörténik.

3. példa

[Zn]-BChl-13²-dekarbometoxi előállítás közvetlen metallálással

13²-dekarbometoxi-BPhe (vagy 13²-dekarbometoxi-BChl) Zn-komplexeket állítunk elő az 1b. példa szerinti eljárásnak megfelelően. A reakcióidő 30 perc, a reakció-hőmérséklet 100 °C. Az izolálást és a tisztítást a 6b vegyületre leírtaknak megfelelően végezzük.

4. példa

[Cu]-BChl, [Cu]-BChl-13²-OH és [Cu]-BChl-13²-dekarbometoxi előállítás közvetlen metallálással

[Cu]-BChl-t (5a) állítunk elő (1a) vegyület vagy (7a) vegyület visszafolytatás melletti forralásával. A forralást körülbelül 70 µM jégecetes oldatban végezzük 250-szeres felesleg vízmentes Cu₂O és 50 mM nátrium-aszkorbát jelenlétében. A melegítést 15 percen 100 °C hőmérsékleten hajtjuk végre. [Cu]-BChl-13²-OH- (5b vegyület) vegyületet állítunk elő szobahőmérsékleten úgy, hogy az (1b) vagy (7b) vegyületet (~70 µM) jégecetes oldat 250-szeres felesleg vízmentes Cu₂O-vegyülettel és 50 mM nátrium-aszkorbáttal elegyítjük. A 13²-dekarbometoxi-BPhe (vagy 13²-dekarbometoxi-BChl) Cu-származékokat az (5b) vegyületre leírt körülmények között állítjuk elő. A Cu₂O alkalmazása ellenére minden esetben Cu-komplexek képződnek, mivel a maradék oxigén jelen van a reakcióelegyen, vagy diszproporcionálódás történik. A termékeket az 1b. fenti példa szerinti eljárásnak megfelelően izoláljuk és tisztítjuk, amely eljárást ott a Zn-komplexekre írunk le, amelyeket jégecetes eljárással állítottunk elő. Így kb. 75% termeléssel (5a) vegyületet és kb. 90% termeléssel (5b) vegyületet, illetve kb. 90% termeléssel (13²-dekarbometoxi-BChl Cu-származék) vegyületet nyerünk.

5. példa

[Cd]-BChl előállítása BPhe közvetlen metallálásával

[Cd]-BChl-vegyületet állítunk elő úgy, hogy 70 µM BPhe dimetil-formamidban készült elegyét 300-szoros feleslegű vízmentes Cd(OAc)₂ jelenlétében visszafolytatás mellett forraljuk. A melegítést 130 °C hőmérsékleten 40 percen át végezzük. A reakció előrehaladását spektroszkópia segítségével követjük, és teljes végbemenetelig végezzük. A nyerstermékeket izoláljuk úgy, hogy az elegyet dietil-éter és telített vizes nátrium-hidrogén-karbonát-oldat között megosztjuk. A terméket szilikagélén redukáló körülmények között (1,5% nátrium-aszkorbát adagolásával) tisztítjuk. Toluol/aceton/trietil-amin 88/10/2 térfogat/térfogat/térfogat eluents alkalmazunk. A reakciót, illetve a feldolgozást szigorúan Ar-védőatmoszférában hajtjuk végre. A tiszta [Cd]-BChl (R_f~0,7) kék színű sávot mechanikusan eltávolítjuk, majd az anyagot dietil-éter/víz eluens segítségével a nyerstermékekre leírtak szerinti extraháljuk. A tiszta terméket valamennyi később leírt transzmetallálási eljárásban alkalmazzuk. A tiszta termék spektrális jellemzőit a (8a) vegyületre az 1. táblázatban adjuk meg.

6. példa

[M]-BChl és [M]-BChl-13²-OH Pd-, Co-, Ni-, Cu-, Zn-, Cd- és Mn-komplexeinek előállítása a [Cd]-BChl és [Cd]-BChl-13²-OH transzmetallálásával

5 A [Pd]-BChl-származékot (2a vegyület) úgy állítjuk elő, hogy az 5. példában nyert [Cd]-BChl- (8a vegyület) vegyületet oldjuk szigorú argonatmoszférában száraz acetonban (A₇₇₀=5 cm⁻¹, ~50 µM). Így megakadályozzuk a C-7- és C-8-helyzetekben a nem szabályozott oxidáció végbemenetelét. Körülbelül 15 perc elteltével az elegyhez kb. 30 mg/100 ml oldat mennyiségű PdCl₂- (Merck, p. a.) reagenst adagolunk, majd az elegyet 40 percen át visszafolytatás melletti forráshőmérsékletre melegítjük. A reakció előrehaladását spektroszkópia segítségével követjük (Q_x-sáv kb. 590 nm értékről kb. 530 nm értékre tolódik a termék keletkezése során). A lényegében tiszta terméket dietil-éter/víz eleggyel történő extrakcióval izoláljuk az 5. példa szerinti [Cd]-BChl izolálására leírt eljárás szerint. Amennyiben szükséges, további tisztítást végzünk szilikagél lapokon a [Cd]-BChl-vegyületre leírtaknak megfelelően. A Pd-BChl (2a vegyület) spektrumadatait az 1. táblázatban adjuk meg.

Hasonló eljárással [Pd]-BChl-13²-OH- (2b vegyület) vegyületet állítunk elő a [Cd]-BChl-13²-OH-vegyület transzmetallálásával, illetve a BChl-vegyület Co, Ni, Cu, Zn és Mn fémkomplexeit (3a, 4a, 5a, 6a és 9a vegyületek) állítjuk elő, valamint a BChl-13²-OH-vegyület komplexeit állítjuk elő (3b, 4b, 5b, 6b és 9b vegyületek) a [Cd]-BChl-, illetve a BChl-13²-OH-vegyületek reakciójával, amelyet a megfelelő fém-kloridokkal végzünk. A vízmentes fém-kloridokat 10-szeres moláris feleslegben alkalmazzuk (Cu: 5a, 5b; Zn: 6a, 6b vegyületek), 100-szoros moláris feleslegben alkalmazzuk (Co: 3a, 3b vegyületek) vagy a Pd-komplekre leírt telített értéken alkalmazzuk (Ni: 3a, 3b; Mn: 9a, 9b vegyületek). A reakciók 25 °C hőmérsékleten gyakorlatilag azonnal lezajlanak, kivéve a Pd, illetve a Ni esetét (kb. 30–40 perc visszafolytatás melletti forralás), és ezek előrehaladását spektroszkópia segítségével követjük. Kis mennyiségű C7–C8 oxidált termék keletkezik (λ_{max} ~680 nm), mivel az elegyen maradék oxigén található. Ezt nátrium-aszkorbát (telített) adagolásával csökkenthetjük. A termékek izolálását és tisztítását az 5. példában a [Cd]-BChl-vegyületre leírtaknak megfelelően végezzük. A termékeket abszorpció-, fluoreszcencia-, ¹H-NMR-spektrum és FAB-MS-spektrum segítségével jellemezzük, amint ezt az 1. táblázatban bemutatjuk. Az UV/VIS abszorpcióspektrumot Perkin Elmer Lambda 2 spektrofotométeren, a fluoreszcencia-emisszió-intenzitást Spex Fluorolog 221 berendezésen, amely 450W xenonlámpával ellátott, végezzük és a fotomultiplikáló cső érzékenysége normaljuk, valamint a gerjesztési energiára normaljuk. A fluoreszcencia-mérés maximális optikai sűrűsége >0,1 cm⁻¹ volt, és a gerjesztés a Q_x-abszorpció sávon történt, az (1a), (1b)–(9a), (9b) vegyületeken. A cirkuláris dikroizmus spektrumokat (CD) Dichrograph CD6 (Jobin Yvon) berendezésen mérjük. A FAB-MS-spektrumokat CH7a/SS tömegspektrofotométeren (Varian MAT) vagy Finigan MAT 9000 spektrofotométeren, amely

Cs-ágyút tartalmaz, és a folyadékfelület-ionizálás m-hidroxi-benzil-alkoholban végzett, mérjük. Az ¹H-NMR-spektrumot 360 MHz-Bruker AM360 modell készüléken mérjük. Oldószerként általában piridin-d₅ oldószer alkalmazunk, a kémiai eltolódást ppm-értékben trimetil-szilán belső standarddal szemben mérjük. Az extinkciós koefficiens ICP/ICPMS atom ab-

szorpciós spektrummal (AAS) mérjük, amelyben a központi fématomra végezzük a mérést; az égetés előtt az (1a), (1b)–(9a), (9b) vegyületek mintáiban az oldószer optikai sűrűség alapján mennyiségileg mérjük, és ezt az oldószer először kvarcüveg csövekben elpárologtatjuk, majd a mintákat tömény salétromsavval kezeljük, és így a fém teljes felszabadulását biztosítjuk.

1. táblázat
(1a), (1b)–(9a), (9b^a) vegyületek spektrumadatai

Vegyület Ion	Abszorpció ^b $\lambda_{\max}$ [nm] (ϵ [10 ⁻³ M ⁻¹ cm ⁻¹])				Emisszió ^c $\lambda_{\max}$ [nm]	M/r _t ^d	FAB-MS molekuláris
	B _Y	B _X	Q _X	Q _Y			
1a (+) ^e	356 (113)	383 (62,7)	525 (28,3)	750 (67,5)	759		
	362 (92,3)	389 (49,3)	532 (26,2)	754 (56,4)			
2a (+)	331 (18,1)	383 (15,4)	529 (6,0)	753 (38,1)	764 (755)	[3,44]	992 (¹⁰⁶ Pd)
	334 (10,4)	388 (11,5)	535 (5,6)	763 (25,5)			
3a (-)	336 (34,8)	388 (27,1)	351 (8,9)	766 (63,7)	– ^f	[3,2] ^g	945 (⁵⁹ Co)
	355 (40,6)	386 (27,5)	562 (10,2)	767 (56,3)			
4a (-) ^h	355 (45,7)	390 (30,4)	531 (11,4)	779 (63,0)	– ^f	[3,18]	944 (⁵⁸ Ni)
	366 (49,2)	391 (30,3)	598 (16,1)	771 (71,8)			
5a (-)	342 (53,3)	390 (42,9)	538 (14,5)	771 (64,1)	– ^f	[3,06]	949 (⁶³ Cu)
	358 (44,7)	395 (31,9)	573 (12,2)	780 (56,1)			
6a (+)	353 (58,9)	389 (39,7)	558 (18,0)	762 (67,7)	782 (772)	[2,48]	950 (⁶⁴ Zn)
	364 (52,4)	390 (31,7)	579 (16,5)	773 (57,1)			
7a (+)	357 (73,3)	390 (48,0)	573 (20,8)	771 (91,0)	788 (778)	1,82	910 (²⁴ Mg)
	374 (57,7)	nem resolvál	612 (16,9)	781 (76,0)			
8a (+)	359 (80,3)	389 (53,5)	575 (22,3)	761 (88,3)	778 (774)	1,78	1000 (¹¹⁴ Cd)
	386 (65,6)	391 (44,1)	593 (19,4)	773 (69,6)			
9a (-)	362 (71,8)	392 (43,0)	587 (18,0)	770 (76,7)	– ^f	1,89	941 (⁵⁵ Mn)
	373 (64,4)	nem resolvál	601 (16,4)	780 (66,0)			

^a A 13²-OH pigmentek (1b–9b vegyületek) abszorpciója és fluoreszcenciaspektruma egymásra helyezhető a 13²-H alapvegyületek spektrumaival, kivéve a Q_X-abszorpció (530–600 nm értékhatár) kékeltolódását, amely körülbelül 5 nm értékkel eltolódik. A tömegspektrum minden esetben 16 egységgel magasabb érték felé tolódott el. Valamennyi hullámhosszat [nm] értékben adtuk meg.

^b Az abszorpció és extinkció koefficiensek (AAS) 298 K értéknél dietil-éterben (felső vonal) és piridinben (alsó vonal, italics).

^c A fluoreszcencia dietil-éter/petroléter/izopropanol 5/5/2 térfogat/térfogat/térfogat elegyben 298K (77K) értéknél.

^d Elektronegativitás (χ_M) és határos ionrádiusz (r_M 10⁻¹⁴m oldatban) hatszoros koordináció esetében (a szögletes zárójelben található adatok a ráduszt négyszeres koordinációban adják meg) Buchler, 1975, közleménye szerint.

^e ¹H-NMR-spektrum piridin-d₅ oldószerben; (+): éles jelek, (–): széles kiterjedt jelek, mivel paramágneses központi fématom van a vegyületben.

^f Nem fluoreszcens anyag (Spex fluorolog 221).

^h Éles ¹H-NMR-jelek C²H₃CN oldószerben.

7. példa

[Pd]-BChl és periferikusan módosított BChl-
vegyületek átszterezése 17³-etil-észterre

A Pd-bakteriofioforibid-a etil-észtert úgy állítjuk elő, hogy 1 mg/ml koncentrációjú [Pd]-BChl kloroformos oldatot képezünk, majd az oldathoz egyenlő térfogatú 5% kénsav térfogat/térfogat tartalmú etanol adagolunk. A reakcióelegyet argonatmoszférában 90 percen át visszafolytatás melletti forráshőmérsékletre melegítjük. Ennek során a [Pd]-BPhe (100 mg) átsztereződik 50 ml kénsav etanol/kloroformos (1:1/térfogat:térfogat) oldatban argonatmoszférában úgy, hogy az átsztereztetést 2,5 órán át végezzük. Ezután a reakcióelegyet étterrel hígítjuk, majd többször 10%-os vizes nátriumhidrogén-karbonát-oldattal mossuk. Ezután a szerves fázist megszáritjuk, majd bepároljuk. Preparatív VRK (kromatográfia) segítségével szilikagélén nitrogénatmoszférában 8% acetontoluol eluens alkalmazásával a terméket tisztítjuk, és a két sávból a lassabban mozgó sávot kinyerjük, így a címbeli vegyületet kapjuk ($R_f=0,75$).

VIS-spektrum bármelyikben: $\lambda_{\max}$ [nm] (relatív intenzitás) 329 (0,45); 385 (0,39); 527 (0,13); 755 (0,1).

¹H-NMR-spektrum [ppm]: 9,25, 8,80, 8,70 (mind-egyik s, 1H, 5-, 10-, 20-H); 4,55 (q, 1H, 18-H); 4,45 (d, 1H, 17-H); 4,10 (q, 2H, 8-CH₂CH₃); 3,85 (s, 3H, 13-CO₂CH₃); 3,7 (d, 1H, 7H); 3,6 (q, 3H, 17³-CH₂CH₃); 3,50, 3,32 (mindegyik s, 3H, 2-, 12-CH₃); 3,30 (m, 1H, 8-H); 3,06 (s, 3H, 3-COCH₃); 3,04 (d, 3H, 7-CH₃); 2,65 (2H, 17¹-H₂); 2,45 (2H, 17²-H₂); 1,75 (d, 3H, 18-CH₃); 1,65 (t, 3H, 8 CH₂CH₃); 1,38 (t, 3H, 17³-CH₂CH₃); 0,10 és -1,90 (s, 2H, 2 NH).

FAB-MS-spektrum Pd-C₃₇H₄ON₄O₆ képlet alapján számított: 742,38 (M+1), mért: 742,2 (M+1).

Az alkalmas savra stabil más fémkomplexek, mint például Ni, Cu, Zn BChl-származékok etil- és más észtereit hasonló eljárásokkal állíthatjuk elő.

8. példa

[Pd]-BChl-17³-szeril-metil-észter [Pd]-BChl-17³-
L-Ser-OME ([Pd]-BChl-Ser) előállítása

A fenti 6. példában előállított [Pd]-BChl átszterezési enzimreakcióját hajtjuk végre L-szerin metil-észter-hidrokloriddal (Sigma) és klorofilláz acetonpor segítségével, amely utóbbit az EEP 0584552 számú szabadalomban írtak le. Így a címbeli vegyületet nyerjük, amely a [Pd]-BChl-Ser (I') általános képletű vegyület, ahol az általános képletben R'₁ jelentése szeril-metil-észter-csoport, amely a szerin hidroxilcsoportján keresztül a COO-csoporthoz kapcsolódik.

Ugyanilyen enzim átszterezési eljárással más [M]-BChl találmány szerinti fémkomplexek 17³-szeril-metil-észterei állíthatók elő, valamint [M]-BChl-17²-észterei állíthatók elő más szerinszármazékok, például N-tritil-L-szerin-metil-észter és N-karbobenzoxi-szeril-szerin-metil-észter vagy tirozinszármazékok, például N-terc-butoxi-karbonil-tirozin-metil-észter alkalmazásával, amint ezt az EP 0584552 számú szabadalomban leírták.

9. példa

[Pd]-BChl-Ser fototoxicitása in vitro körülmények között

9a. Baktérium és vírus

A fototoxicitás-tesztvizsgálat három elkülönülő lépésre osztható: a bakteriális oldat inkubálása szenzibilizálószerrel együtt, a besugárzás, illetve a fototoxicitás mérése.

Friss *S. aureus* foszfátpufferelt fiziológiás sóoldat (PBS)-szuszpenziót (körülbelül 1×10^7 baktérium/200 μ l) inkubálunk adott koncentrációjú [Pd]-BChl-Ser vagy BChl-Ser adott koncentrációban alkalmazott mennyiségével 1 órán át sötétben. Ezt követően centrifugálással pigmentsmentesre mossuk, majd PBS-oldatban újra szuszpendáljuk. A mosott baktériumsuszpenziókat 5 percen át besugározzuk. Fényforrásként saját magunk által készített xenonlámpát alkalmaztunk, amelynek függőleges emissziója 1000 lux/cm² a célszinten, és folyadéksűrűt (klorofill-a O. D.=10,00 660 nm érték mellett) tartalmaz. A fotodinamikus károsodást úgy mértük, hogy a baktérium-túlélést meghatároztuk: a besugárzott baktériumsuszpenzió 30 μ l-es mintáit 3 ml agy-szív infúzióban (BHI), amely folyékony baktérium táptalaj, tenyésztettük 2 órán át 37 °C hőmérsékleten. A tenyésztést rázatás közben végeztük, majd a baktériumsűrűséget $\lambda=660$ nm értéken turbiditásméréssel határoztuk meg.

Valamennyi kísérlet esetében (a) egy kísérleti (a teljes kezelésnek alávetett) baktériumcsoportot és három kontrollcsoportot alkalmaztunk; (b) szenzibilizáló nélkül besugárzott baktériumot alkalmaztunk, (c) szenzibilizálóval kezelt, de nem besugárzott baktériumot alkalmaztunk, és (d) nem kezelt baktériumot alkalmaztunk (100% túlélés).

Amint az 1. ábrán bemutatjuk, a [Pd]-BChl-Ser fototoxicitása dóziszfüggő, és függ a szenzibilizálókonzentrációtól (LD₅₀~0,6 μ M), és sötétben nem tapasztaltunk toxicitást. Hasonló eredményeket nyertünk BChl-Ser alkalmazása esetében, amelyet ugyanilyen körülmények közötti tesztvizsgálatnak vetettünk alá. Ez a vegyület kissé alacsonyabb LD₅₀-értéket mutatott, azonban az eltérés nem volt jelentős.

A tesztvizsgálatot megismételtük *B. subtilis* és *Propionibacterium acnes*, valamint *Herpes Simplex Virus 1* (HSV-1) alkalmazásával szuszpenzióban és fertőzött sejtekben, és hasonló fototoxicitáseredményeket nyertünk (a táblázatban és ábrán nem mutatott).

9b. Melanomasejtek

A tesztvizsgálatot az „Anyagok és eljárások” pontban leírtak szerint a (iv)–(viii) pontoknak megfelelően végeztük. Monoréteges M2R sejteket inkubáltunk adott koncentrációjú [Pd]-BChl-Ser jelenlétében 1 órán át. Ezt követően a fentiek szerint fotodinamikus kezelésnek vetettük alá. A fotocitotoxicitást [³H]-timidinbeépüléssel mértük, és a kezelt sejtek túlélési százalékával, valamint a megfelelő kontrollok százalékával adtuk meg a 2. ábrán. A túlélés százalékát a nem kezelt sejtek esetében 100%-nak vettük.

A 2. ábra adataiból kitűnik, hogy a [Pd]-BChl-Ser esetében a fototoxicitás dóziszfüggő, és az anyag kon-

centrációjától függ. Az LD₅₀ értéke kb. 0,05 µM. Nem tapasztaltunk fototoxicitást sötét kontrollcsoportok esetében.

Referenciák

1. Buchler, J. W., 1975, „Static coordination chemistry of metalloporphyrins” (Metalloporfirinek statikus koordinációs kémiája), Porphyrins and Metalloporphyrins, Smith, K. M., 157–232, Elsevier, New York.
2. Chen, L., Y. Mory, A. Zilberstein és M. Revel, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85., 8037–41.
3. DeJordy, J. O., P. Bendel, A. Horowitz, Y. Salomon és H. Degani, 1992, J. Magn. reson. Imag., 2, 695–700.
4. Gerst, J. E., J. Sole, J. P. Mather és Y. Salomon, 1986, Mol. Cell. Endocrinol., vol. 46, 137–47.
5. Hynninen P. H.: Scheer, 1991, 145–209.
6. Loves és munkatársai, 1990, Opt. Spektrosk., 69, 97–101.
7. Matthews, J. L. és munkatársai, 1988, Transfusion, 81–83.
8. Ofmata, T. és N. Murata, 1983, „Preparation of Chlorophyll a, Chlorophyll b and Bacteriochlorophyll a by column chromatography with DEAE-Sepharose C1–6B and Sepharose C1–6B” (Klorofil-a, klorofil-b és bakterioklorofil előállítása oszlopkromatográfia segítségével DEAE-Sepharose C1–6B és Sepharose C1–6B segítségével), Plant Cell Physiol., vol. 24, 1097–1100.
9. Rosenbach–Belkin, V., 1988, „The primary reactants in bacterial photosynthesis modelling by *in vitro* preparation” (Bakteriális fotoszintézis modellben *in vitro* preparátum esetében az elsődleges reaktánsok), Ph. D. Thesis, Weizmann Institute of Science, Israel.
10. Schaber, P. M., J. E. Hunt, R. Fries és J. J. Katz, 1984., J. Chromatogr. 316, 25–41.
11. Scheer, H., 1991, *Chlorophylls*, CRC Press, Boca Raton, Florida.
12. Scherz, A. és W. W. Parson, 1984, Biochim. Biophys. Acta, 766, 653–55.
13. Strell, M. és Urumow, T., 1977, Liebigs Ann. Chem., 970–974.
14. Struck, A., 1990, „Chemisch modifizierte Bacteriochlorophylle und -phaeophytine in den Bindungsstellen B_{A,B} und H_{A,B} von photosynthetischen Reaktionszentren aus Rhodobacter sphaeroides R26: Pigmentsynthese, Pigmenttausch und Spektroskopie” (B_{A,B} és H_{A,B} fotoszintézisében a kémiai módosított bakterioklorofil és faeofitin szerepe, például amelyeket szeroidokból R26 nyertünk: pigment szintézis, pigmentállapot és spektroszkópia), Ph. D. Thesis, University of Munich, Germany.
15. Struck, A. és munkatársai, 1992, Bacteriochlorophylls modified at position C-3: Long-range intramolecular interaction with position C-13.2 (C-3 helyzetben módosított bakterioklorofil: a C-13.2 helyzettel való hosszú időtartamú intramolekuláris kölcsönhatás), Biochim. Biophys. Acta, 1101:321–328.
16. Struck, A. és Scheer, H., 1990, „Modified reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides* R26.1. Exchange of monomeric bacteriochlorophyll with 132-hydroxi-bacteriochlorophyll” (Módosított reakciócentrumok, amelyeket *Rhodobacter sphaeroides* R26 nyertünk. 1. monomer bakterioklorofil kicserélődése 132-hidroxi-bakterioklorofillal), FEBS Lett. 261, 385–388.
17. Svec, W. A., 1991, „The distribution and extraction of the Chlorophylls” (Klorofil eloszlása és extrahálása): Scheer, 1991, 89–102.
18. Wasielewsky, M. R., 1977, „A mild method for the introduction of Magnesium into bacteriopheophytin-a” (Enyhe reakció magnézium bevezetésére bakteriopheofitin-a vegyületben), Tetrahedron Letters, 1373–76.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás (I), (II) vagy (III) általános képletű [M]-BChl szintetikus fémszubsztituált bakterioklorofil-származékok előállítására, ahol az általános képletekben
- M jelentése a Cd (r₉₅ pm)-nál kisebb ionsugarú fématom, amely fématom az alábbiak közül választható:
 - két vegyértékű fématom, mégpedig Pd, Co, Ni, Cu, Zn vagy Mn,
 - három vegyértékű fématom, mégpedig Fe, Mn vagy Cr, vagy
 - négyszeres vegyértékű fématom, mégpedig Sn vagy Pt,
- R₁ jelentése 1–25 szénatomos szénhidrogéncsoport,
- R₂ jelentése hidrogénatom, hidroxilcsoport vagy –COOR₅ általános képletű csoport, ahol R₅ jelentése 1–12 szénatomos alkilcsoport vagy 3–12 szénatomos cikloalkilcsoport;
- R₃ jelentése hidrogénatom, hidroxilcsoport vagy 1–12 szénatomos alkilcsoport, vagy 1–12 szénatomos alkoxycsoport;
- R₄ jelentése egymástól függetlenül vinilcsoport, etilcsoport, acetilcsoport, 1-hidroxi-etil-csoport és éterek, valamint észterek;
- azzal jellemezve, hogy
 - (i) valamely, a fenti BChl képletnek megfelelő, dimetilformamidban feloldott bakteriofenofitinszármazékot argonatmoszférában dehidratált Cd-acetáttal reagáltatunk, és a [Cd]-BChl komplexet a reakcióelegyből kromatográfia segítségével, redukáló reakciókörülmények között izoláljuk;
 - (ii) a száraz acetonban feloldott és az (i) lépésben nyert [Cd]-BChl komplexet egy megfelelő dehidratált fémsó-reagenssel, amely lehet fém(M)-klorid, -acetát és -acetil-acetonát, reagáltatjuk argonatmoszférában; és
 - (iii) a kívánt fémszubsztituált [M]-BChl-származékot a reakcióelegyből kinyerjük.
2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az (I), (II) vagy (III) általános képletű [M]-BChl-származékot – melyeknél a szubsztituensek jelentése az 1. igénypontban megadott – a továbbiakban R'–OH képletű vegyülettel, a 173-helyzetben átészterezési reakciókörülmények között reagáltatjuk, és így az (I'), (II') vagy (III') általános képletű [M]-BChl-származékot állítjuk elő, ahol az általános képletekben

R'_1 jelentése

- (i) 1–25 szénatomos szénhidrogéncsoport, amely kívánt esetben halogénatom, oxocsoport, hidroxilcsoport, –CHO-csoport, karboxilcsoport vagy aminocsoport szubsztituenszt tartalmazhat, vagy ugyanilyen csoport, amelyet egy vagy több heteroatom szakít meg, amely lehet oxigénatom, kénatom vagy –NH-csoport, illetve a megszakítócsoporthoz lehet fenilcsoport is;
 - (ii) valamely aminosav- vagy peptidcsoport, amely egy hidroxilcsoportot tartalmaz vagy ezek származéka, amely lehet C_{1-4} alkil-észter vagy N-védett származék, ahol az N-védőcsoport terc-butoxi-, karbobenzil-oxi- vagy tritilcsoport, és ahol a hidroxilezett aminosav vagy ennek származéka a –COO-csoporttal hidroxilcsoporton keresztül kapcsolódik;
 - (iii) a (ii) pontban megadott peptidcsoport, amely –COO-csoporttal egy 1–25 szénatomos szénhidrogéncsoporton keresztül kapcsolódik, amely kívánt esetben halogénatom, oxocsoport, hidroxilcsoport, formilcsoport, karboxilcsoport vagy aminocsoport szubsztituenszt tartalmazhat, vagy ugyanilyen csoport, amelyet egy vagy több heteroatom szakít meg, ahol a heteroatom lehet oxigénatom, kénatom vagy –NH-csoport, vagy a megszakítócsoporthoz fenilcsoport is lehet, továbbá egy vég-funkcióscsoporttal szubsztituált, amely lehet hidroxilcsoport, karboxilcsoport vagy aminocsoport; és
 - (iv) egy sejt-specifikus ligandumcsoport, amely lehet peptidcsoport és proteincsoport, amely közvetlenül kapcsolódik a –COO-csoporttal egy 1–25 szénatomos szénhidrogéncsoporton keresztül kapcsolódik, mely kívánt esetben halogénatom, oxocsoport, hidroxilcsoport, formilcsoport, karboxilcsoport vagy aminocsoport szubsztituenszt tartalmazhat, vagy egy vagy több heteroatommal megszakított, ahol a heteroatomok lehetnek oxigénatom, kénatom vagy –NH-csoport, vagy fenilcsoport megszakítócsoporthoz is tartalmazhat, továbbá egy végcsoport funkcióscsoport szubsztituenszt tartalmaz, amely lehet hidroxilcsoport, karboxilcsoport vagy aminocsoport;
- R_2 jelentése hidrogénatom, hidroxilcsoport vagy –COOR₅ általános képletű csoport, ahol R₅ jelentése 1–12 szénatomos alkilcsoport vagy 3–12 szénatomos cikloalkilcsoport,
- R_3 jelentése hidrogénatom, hidroxilcsoport vagy 1–12 szénatomos alkilcsoport, vagy 1–12 szénatomos alkoxycsoport;
- R_4 mindegyikének jelentése egymástól függetlenül vinilcsoport, etilcsoport, acetylcsoporthoz és ezek éterei, valamint észterei; és
- M jelentése fématom, amelynek ionsugara kisebb, mint a Cd (≈ 95 pm) ionrádiusza és az M fém lehet két vegyértékű fématom, mégpedig lehet Pd, Co, Ni, Cu, Zn és Mn, három vegyértékű fématom, mégpedig Fe, Mn és Cr, valamint négy vegyértékű fématom, mégpedig Sn és Pt.

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás olyan [M]-BChl-származék előállítására, amelyben az M fém Pd, Cu, Ni, Co, Zn vagy Mn, és a BChl bakterioklorofilcsoport olyan (I) általános képletű csoport, ahol az általános képletben R_1 jelentése fitilcsoport vagy geranil-geranil-csoport, R_2 jelentése –COOCH₃ képletű csoport, R_3 jelentése hidrogénatom vagy hidroxilcsoport, R_4 jelentése a 3-helyzetben acetylcsoporthoz és a 8-helyzetben etilcsoport, *azzal jellemezve*, hogy a megfelelő kiindulási anyagokat alkalmazzuk.

4. Az 1–3. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a (ii) reakciólépésben fém(M)-sóként valamely fém-kloridot alkalmazzunk.

5. Az 1–4. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az (i) reakciólépést és a (ii) reakciólépést kombináltan egy lépésben hajtjuk végre, és a bakteriofeofitinszármazékot a megfelelő dehidratált fém(M)-só feleslegben vett mennyiségével reagáltatjuk katalitikus mennyiségű dehidratált Cd-acetát jelenlétében dimetil-formamid vagy acetone oldószerben.

6. Az (I'), (II') vagy (III') általános képletű, a 2. igénypont szerinti eljárással előállított fémszubsztituált bakterioklorofil-származék, kivéve azokat az (I') általános képletű vegyületeket, ahol az általános képletben R_2 jelentése –COOCH₃ képletű csoport, R_3 jelentése hidrogénatom, R_4 jelentése a 3-helyzetben acetylcsoporthoz és a 8-helyzetben etilcsoport, R'_1 jelentése fitilcsoport vagy etilcsoport és M jelentése Pd, vagy ahol R'_1 jelentése metilcsoport vagy fitilcsoport és M jelentése Cu vagy Zn.

7. A 6. igénypont szerinti (I') általános képletű fémszubsztituált bakterioklorofil-származék, ahol az általános képletben R'_1 jelentése fitilcsoport vagy geranil-geranil-csoport, R_2 jelentése –COOCH₃-csoport, R_3 jelentése hidrogénatom, R_4 jelentése a 3-helyzetben acetylcsoporthoz és a 8-helyzetben etilcsoport és M jelentése Co, Ni vagy Mn.

8. A 6. igénypont szerinti (I') általános képletű fémszubsztituált bakterioklorofil-származék, ahol az általános képletben R'_1 jelentése fitilcsoport vagy geranil-geranil-csoport, R_2 jelentése –COOCH₃-csoport, R_3 jelentése hidroxilcsoport, R_4 jelentése a 3-helyzetben acetylcsoporthoz és a 8-helyzetben etilcsoport és M jelentése Pd, Co, Ni vagy Mn.

9. A 6. igénypont szerinti (I') általános képletű fémszubsztituált bakterioklorofil-származék, ahol az általános képletben R'_1 jelentése etilcsoport, R_2 jelentése –COOCH₃-csoport, R_3 jelentése hidrogénatom, R_4 jelentése a 3-helyzetben acetylcsoporthoz és a 8-helyzetben etilcsoport és M jelentése Ni, Zn vagy Cu.

10. A 6. igénypont szerinti (I') általános képletű fémszubsztituált bakterioklorofil-származék, ahol az általános képletben R'_1 jelentése szilil-metil-észter, R_2 jelentése –COOCH₃-csoport, R_3 jelentése hidrogénatom, R_4 jelentése a 3-helyzetben acetylcsoporthoz és a 8-helyzetben etilcsoport és M jelentése Pd.

11. Gyógyszerkészítmény, amely a 6. igénypont szerinti (I'), (II') vagy (III') általános képletű fémszubsztituált bakterioklorofil-vegyületet és gyógyszerészetiileg elfogadható hordozóanyagot tartalmaz.

12. A 11. igénypont szerinti gyógyszerkészítmény, amely a 10. igénypont szerinti fémszubsztituált bakterioklorofillvegyületet tartalmazza.

13. A 6. igénypont szerinti (I'), (II') vagy (III') általános képletű fémszubsztituált bakterioklorofillvegyü-

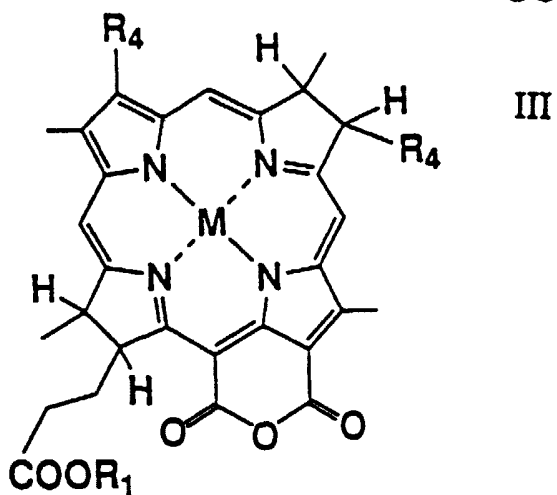
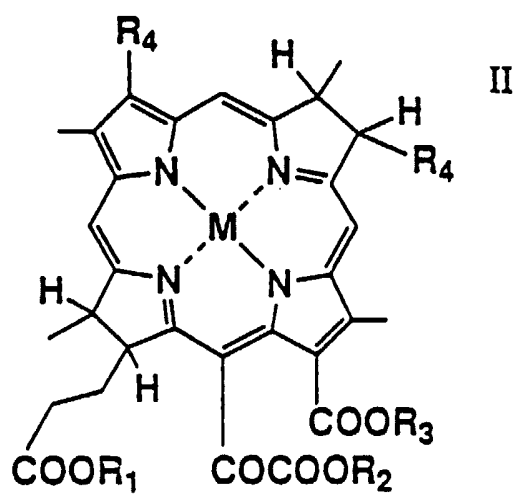
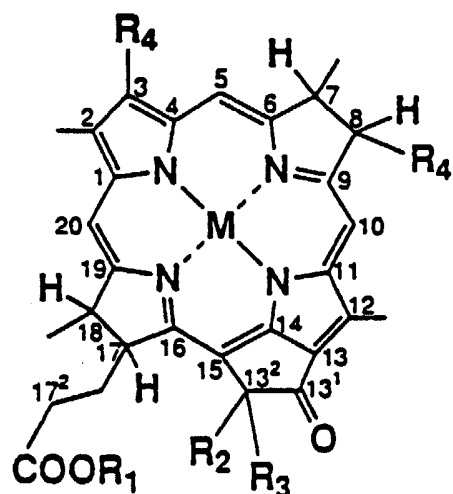
letek alkalmazása gyógyszerkészítmény előállítására, amely gyógyszerkészítmény fotodinamikus terápiában alkalmazható.

14. A 6. igénypont szerinti (I'), (II') vagy (III') általános képletű fémszubsztituált bakterioklorofillvegyü-

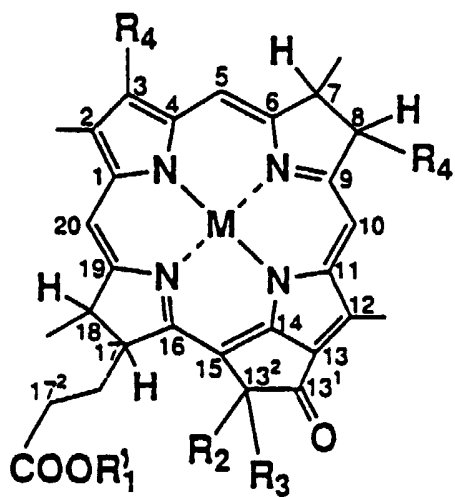
let alkalmazása gyógyszerkészítmény előállítására, amely tumordiagnózisban alkalmazható.

15. A 6. igénypont szerinti (I'), (II') vagy (III') általános képletű fémszubsztituált bakterioklorofillvegyület alkalmazása gyógyszerkészítmény előállítására, amely sejtek vagy fertőző hatóanyagok, mégpedig baktériumok vagy vírusok elpusztítására alkalmazható.

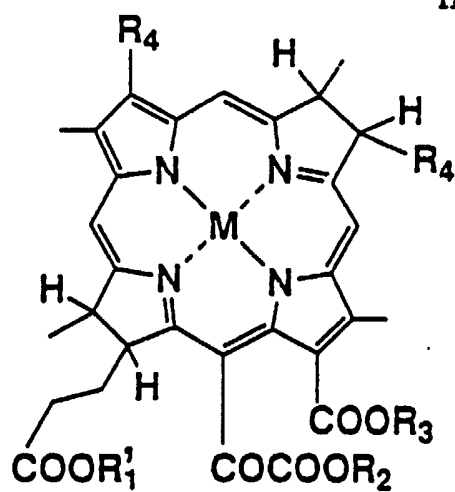
16. A 15. igénypont szerinti alkalmazás biológiai termékekben található fertőző hatóanyagok elpusztítására használható gyógyszerkészítmények előállítására.



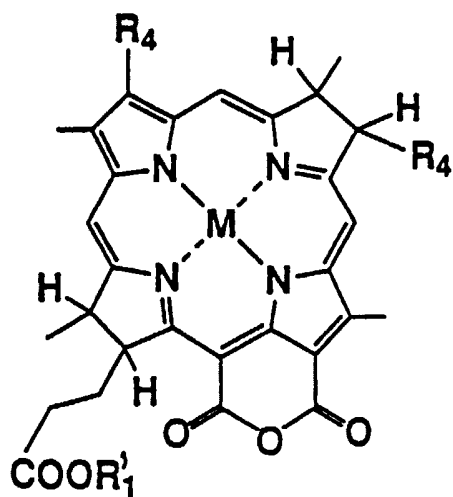
I'

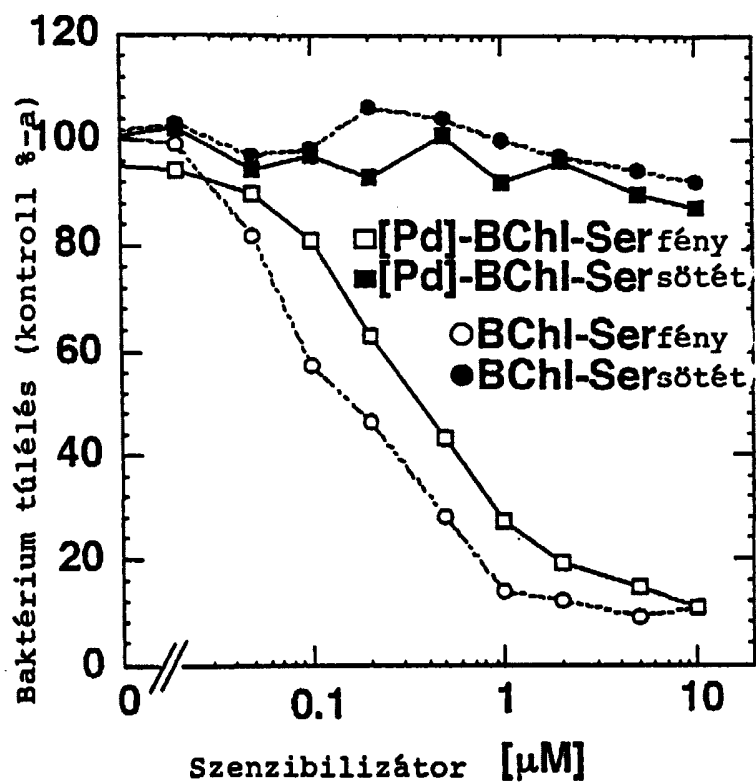


II'

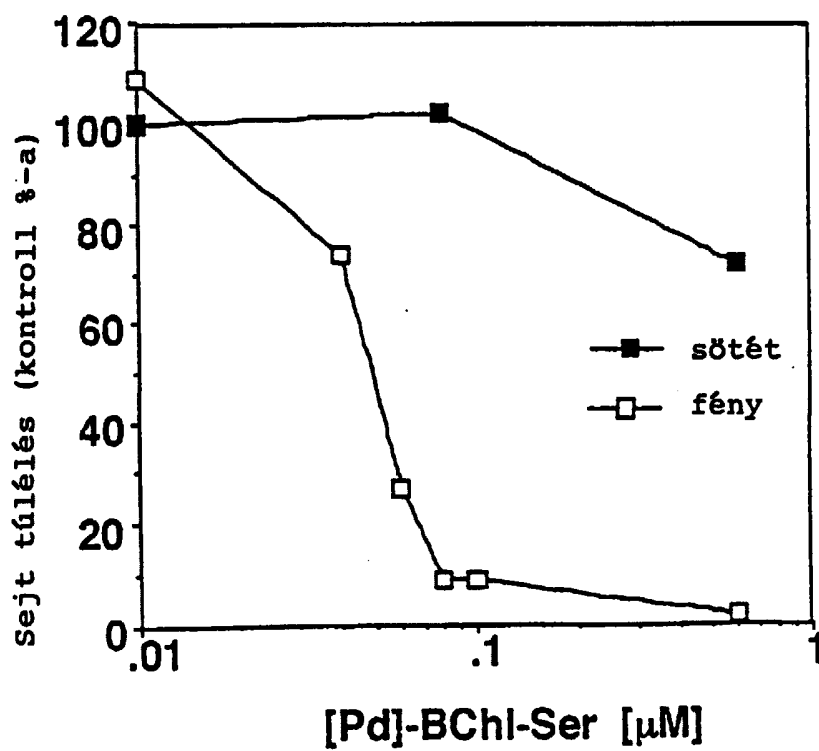


III'





1. ábra



2. ábra