



F1000096685B



SUOMI-FINLAND
(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(B) (11) **KUULUTUSJULKAISU**
UTLAGGNINGSSKRIFT 96685
(45) **Patentti myönnetty**
Patent meddelat 12 08 1996

(51) Kv.1k.6 - Int.c1.6

C 07D 311/80

(21) Patentihakemus - Patentansökning	880332
(22) Hakemispäivä - Ansökningdag	26.01.88
(24) Alkupäivä - Löpdag	26.01.88
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	28.07.88
(44) Nähtävöksipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	30.04.96
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet	
	27.01.87 US 007838 P

(71) Hakija - Sökande

1. F. Hoffmann-La Roche AG, 4002 Basel, Switzerland, (CH)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. McNally, Alan Joseph, 255 River Road, North Arlington, NJ 07032, USA, (US)
2. Schwartz, Alan, 10 Watchung Avenue, Upper Montclair, NJ 07043, USA, (US)
3. Usategui, Magdalena, 40 Marlo Road, Wayne, NJ 07473, USA, (US)

(74) Asiamies - Ombud: Oy Kolster Ab

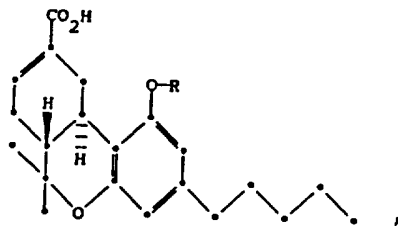
(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Uusia kannabinolijohdannaisia ja niiden käyttö kannabinolimetaboliittien immuunimäärityksessä
Nya kannabinolderivat och användning av dessa vid immunbestämning av kannabinolmetaboliter

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

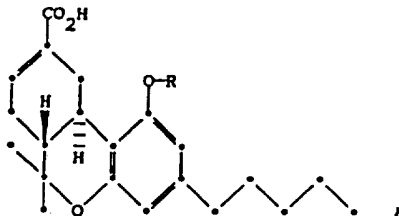
(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö koskee uusia kannabinolijohdannaisia, joita voidaan käyttää parannetuissa immuunimäärityksissä kannabinolimetaboliittien toteamiseksi veri- tai virtsanäytteistä. Uusien kannabinolijohdannaisten kaava on



jossa R on liitosketju, joka valitaan ryhmästä, joka koostuu p-aminobentsyyli-ryhmästä, tai 1-7 hiiliatomiä käsittävistä haarautuneen ketjun omaavasta tai suoraketjuisesta aminoalkyyli-ryhmästä, tämän orgaanisen hapon tai mineraalihapon kanssa muodostamasta suolasta, p-aminobentsyyli- tai aminoalkyyli-ryhmän isosyanaatti- tai isotiosyanaattijohdannaisesta, 1-7 hiiliatomiä käsittävän aminoalkyyli-ryhmän karboksyyli-ryhmän johdannaisesta tai tämän suolasta ja karboksyyli-ryhmän johdannaisten aktivoituneista johdannaisista.

Uppfinningen avser nya kannabinolderivat, vilka kan användas i förbättrade immunbestämningar för detektering av kannabinolmetaboliter i blod- och urinprov. De nya kannabinolderivaten har formeln:



vari R är en vidhängande kedja, vilken valts bland en p-aminobensylgrupp eller en förgrenad eller lineär aminoalkylgrupp med 1-7 kolatomer eller ett additionssalt med en organisk eller oorganisk syra, ett isocyanat eller isotiocyanatderivat av p-aminobensyl- eller aminoalkylgruppen, ett karboxyländat derivat av aminoalkylgruppen med 1-7 kolatomer eller ett salt därav, och ett aktiverat derivat av det karboxyländade derivatet.

Uusia kannabinolijohdannaisia ja niiden käyttö kannabinolimetaboliittien immuunimäärityksessä

5 Tämä keksintö koskee uusia tetrahydrokannabinolijohdannaisia ja näiden johdannaisten käyttöä reagensseina parannetuissa immuunimäärityksissä kannabinolimetaboliittien määrittämiseksi biologisista nestenäytteistä.

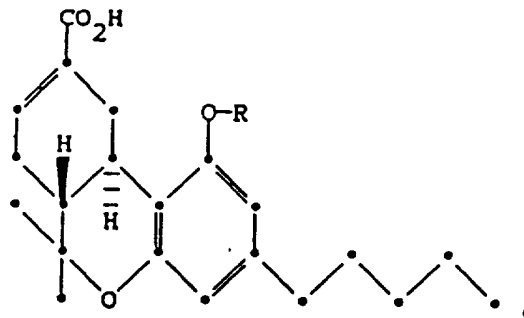
10 Marihuanan käytön lisääntyminen on johtanut määrityksen kehittämiseen kasvin pääasiallisen vaikuttavan aineosan, Δ^9 -tetrahydrokannabinolin (THC:n), ja erityisesti THC-metaboliittien toteamiseksi virtsa- ja verinäytteistä. Näissä määrityksissä käytetään leimattuja kannabinolijohdannaisia sekä huumemetaboliittien vasta-aineita.

15 Käytännössä veri- tai virtsanäyte, jonka epäillään sisältävän kannabinolimetaboliitteja (mukaanlukien glukuronidit ja muut konjugaatiotuotteet), saatetaan kosketuksiin vasta-aineiden kanssa leimatun johdannaisen läsnäollessa. Siinä määrin kuin näyte sisältää kannabinolimetaboliitteja, ilmenee kilpailua vasta-aineiden sitoutumiskeskuksista, ja sitoutuneen leimatun johdannaisen määrä vähenee suhteessa kyseisen kilpailun voimakkuuteen.

20 Kuvauksia eräistä tyyppillisistä immuunimäärityksistä löytyy lähteistä O'Connor et. al. J. Anal. Toxicol. 5:168 (1981), Law et. al. J. Anal. Toxicol. 8:14 (1984) ja Childs et. al. J. Anal. Toxicol. 8:220 (1984). Kussakin viitteessä kuvattu määrittäminen perustuu siihen, että osa leimatusta kannabinolijohdannaisesta syrjäytetään ja korvataan määrittämisnäytteen sisältämällä metaboliiteilla. Hyviä määrittämistuloksia saadaan vasta-aineiden tunnistuksessa spesifisesti leimatun johdannaisen mutta erilaisten kannabinolimetaboliittien silti helposti syrjäyttäessä kyseisen johdannaisen.

30 Kyseinen keksintö koskee uusia kannabinolijohdannaisia, joiden kaava on

5



10 jossa R on liitosketju, joka on p-aminobentsyyli-ryhmä tai
1 - 7 hiiliatomia sisältävä haarautunut tai suoraketjuinen
aminoalkyyli-ryhmä tai tämän happoadditiosuola orgaanisen
hapon tai mineraalihapon kanssa, ja joka yhdiste on mahdol-
15 lisesti kovalenttisesti sidottu leimamolekyylisiin havaitse-
misen helpottamiseksi.

Tämä keksintö koskee edelleen edellä mainittujen
yhdisteiden leimattujen johdannaisten käyttöä yhdessä kan-
nabinolimetaboliittien tai niiden johdannaisten vasta-ai-
neiden kanssa kannabinolimetaboliittien toteamiseksi veri-
20 tai virtsanäytteistä. Leimattujen johdannaisyhdisteiden,
jotka käsittävät keksinnön mukaisen yhdisteen sidottuna
kovalenttisesti sopivaan leimamolekyylisiin, käyttö helpottaa
metaboliittien toteamista.

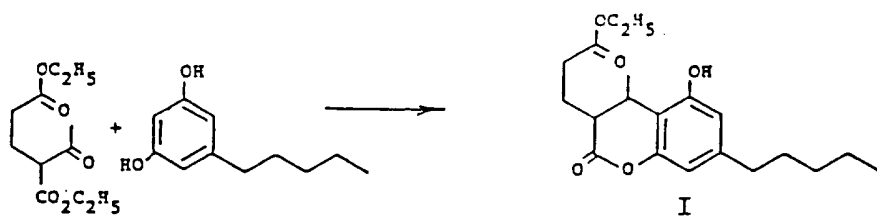
Kyseinen keksintö avautunee helpommin oheisten kaa-
25 vioiden välityksellä, joista

kaaviossa 1 esitetään (trans-rac)-1-(3-aminopropok-
si)-6a,7,10,10a-tetrahydro-6,6-dimetyyli-3-pentyyli-6H-di-
bentso(b,d) pyraani-9-karboksylihappomonohydrokloridin
synteesiin liittyvien lähtöaineiden ja välituotteiden kaa-
30 vat, ja

kaaviossa 2 esitetään (trans-rac)-6a,7,10,10a-tetra-
hydro-1(4-aminobentsyyli)-6,6-dimetyyli-3-pentyyli-6H-di-
bentso(b,d)pyraani-9-karboksylihapon synteesin välituot-
teiden ja lopputuotteen kaavat.

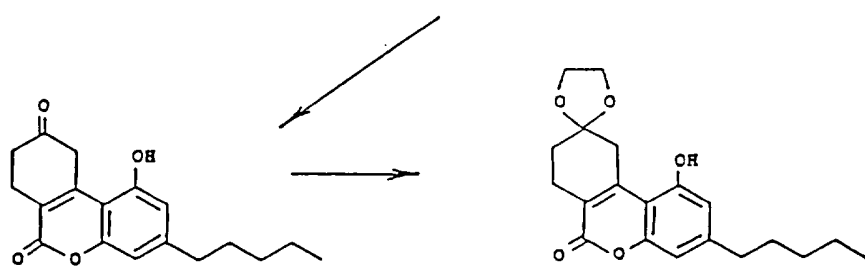
Kaavio 1

5



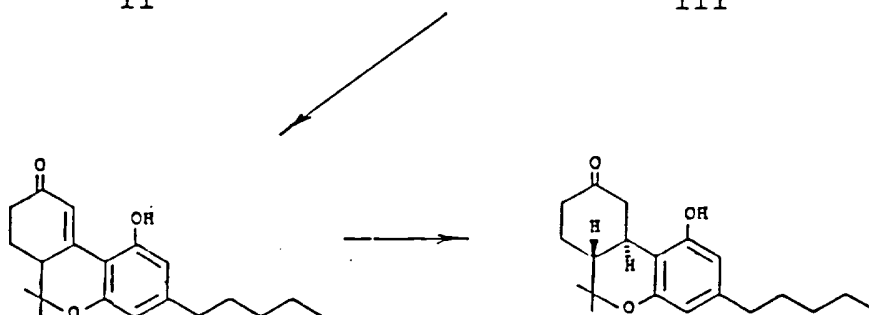
I

10



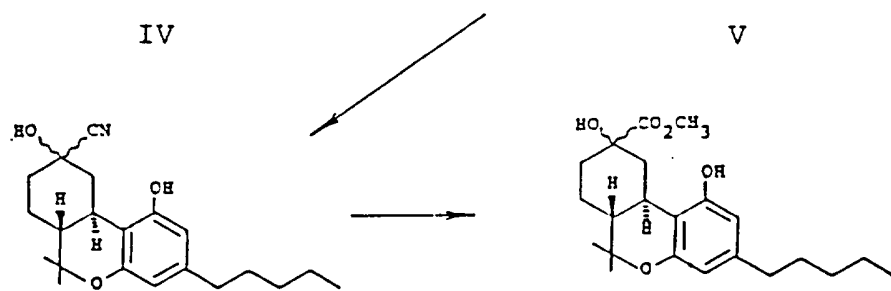
III

15



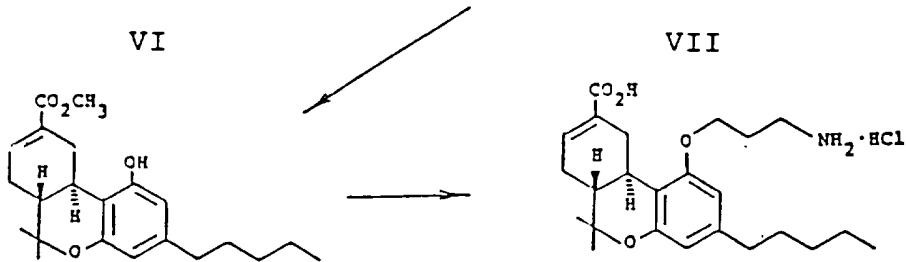
V

20



VII

25



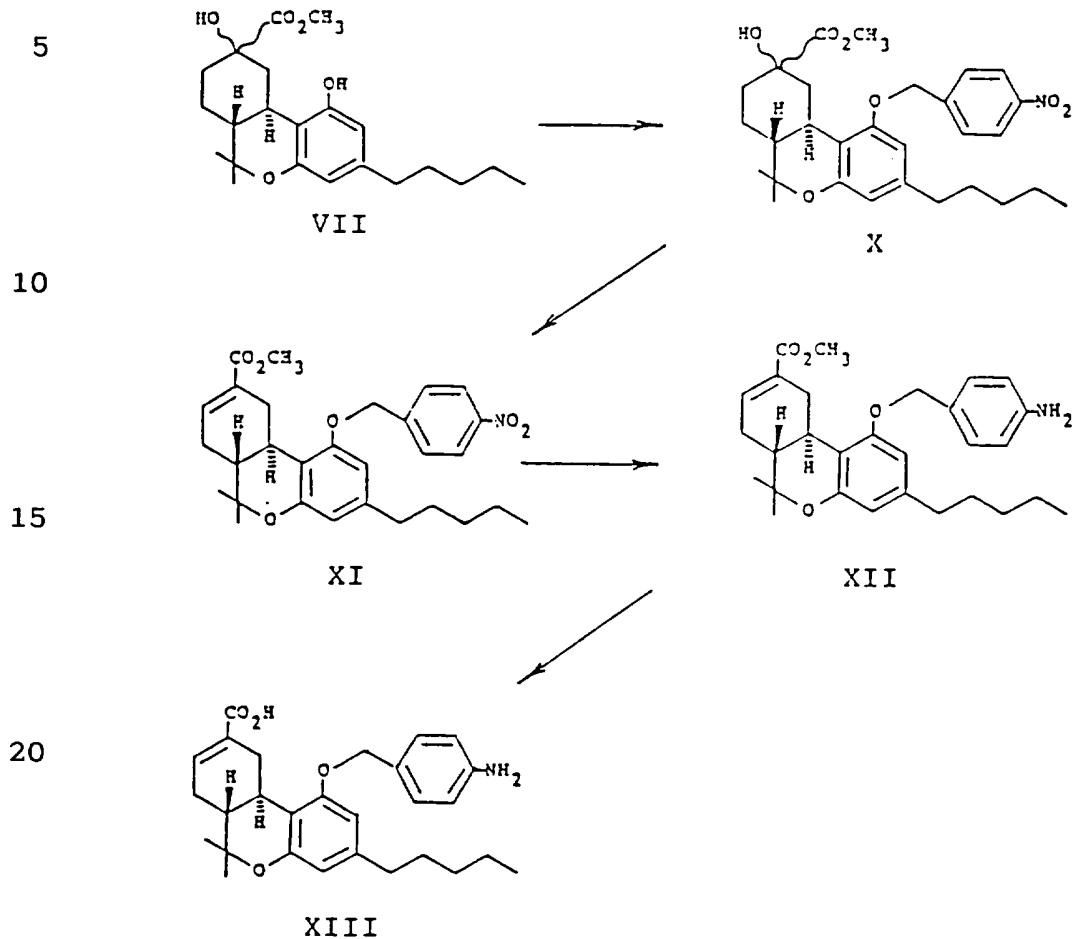
IX

30

35

VIII

Kaavio 2



25 Kuviossa esitetään graafisesti THC:n immuunimääri-
tykselle standardikäyrä, jossa absorbanssin muutos 492 nm:n
aallonpituudessa on esitetty 9-karboksi-11-nor- Δ^9 -tetrahyd-
rokannabinolipitoisuuden funktiona.

30 Kyseisen keksinnön mukaiset immuunimääritykset on
tarkoitettu kannabinolimetaboliittien määritykseen bioloi-
sista nesteistä, kuten ihmisen veri- tai virtsanäytteistä.
Tässä käytettynä termillä kannabinolimetaboliitti tarkoite-
taan Δ^8 - tai Δ^9 -tetrahydrokannabinolia tai näiden yhdis-
teiden kataboliatuotteita, mukaanlukien konjugaatiotuo-
35 teet kuten glukuronidit. Termillä kannabinolijohdannainen

tarkoitetaan kemiallisesti syntetisoitua Δ^8 - tai Δ^9 -tetrahydrokannabinolin johdannaista.

5 Keksinnössä käytettyjä vasta-aineita voidaan valmistaa käyttäen mitä tahansa laajasta valikoimasta mahdollisia immunogeenejä. Nämä immunogeenit käsittävät kannabinolimetaboliitin tai sen johdannaisen konjugoituna sopivaan immunogeeniseen kantajamolekyylisiin. Konjugointi kantajaan on välttämätön, koska itse kannabinolimetaboliitit tai niiden johdannaiset ovat hapteneja (molekyylejä, jotka kykenevät 10 sitoutumaan spesifisesti vasta-aineeseen mutta eivät kykene aikaansaamaan vasta-ainetuotantoa, eli eivät ole immunogeenisiä).

Tässä käytettynä termillä immunogeeninen kantajamolekyylisi tarkoitetaan makromolekyylejä, jotka kykenevät itsenäisesti tuottamaan immuunivasteen isäntäeläimessä ja 15 jotka voidaan liittää kovalenttisesti kannabinolimetaboliittiin tai sen johdannaiseen. Sopivia kantajamolekyylejä ovat esim. proteiinit; luontaisesti esiintyvät tai syntetiset polymeeriyhdisteet kuten polypeptidit; polysakkaridit 20 jne. Erityisen edullisia ovat proteiinikantajamolekyylit. Kantajamolekyylisiin sidottuna kannabinolimetaboliitista tai sen johdannaista tulee immunogeeninen yleisesti tunnetun kantajaefekti-ilmiön johdosta.

25 Tässä keksinnössä käytettäväksi soveltuvia proteiinikantajia mainittuihin rajoittumatta ovat nisäkässeerumi-proteiinit kuten takertuva avainmenreikähemosyaniinihumani- tai nautagammaglobuliini, humaani-, nautatai kaniininseerumialbumiini ja näiden proteiinien metyylijohdannaiset tai muut johdannaiset. Alan ammattilaisille muutkin soveltuvat proteiinikantajat ovat ilmeisiä. Edullisesti mutta ei välttämättä, proteiinikantajana käytetään proteiinia, joka ei ole peräisin isäntäeläimestä, jossa kannabinolimetaboliitin tai sen johdannaisen vasta-aineita halutaan tuottaa.

35 Kovalenttinen sitoutuminen kantajamolekyylisiin voidaan suorittaa alan ammattilaisten hyvin tuntemilla mene-

telmillä, jolloin käytetyn menetelmän nimenomaisen valinnan määrää kannabinolimetaboliitissa tai sen johdannaisessa ja kantajamolekyylissä sitoutumiseen käytettävissä olevien funktionaalisten ryhmien luonne.

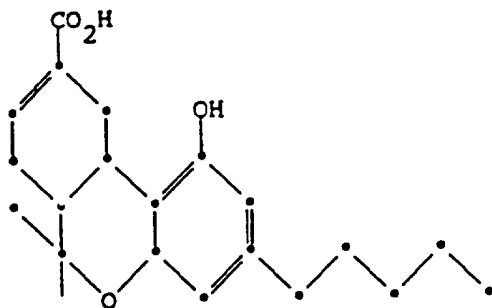
5 Kun immunogeeni on valmistettu, sitä voidaan käyttää indusoimaan kannabinolimetaboliiteille spesifisten vasta-
aineiden muodostumista isäntäeläimissä ruiskuttamalla im-
munogeeniä kyseiseen isäntäeläimeen, käyttäen edullisesti
10 apuainetta kuten Freundin täydellistä tai epätäydellistä
tehostetta tai muuta vastaavaa. Sopivia isäntäeläimiä ovat
kaniinit, hevoset, vuohet, marsut, rotat, lehmät, lampaat
jne. Saatavan vastaseerumin tulee olla sellaista, että sen
sisältämät vasta-aineet, joita kutsutaan anti-THC-vasta-ai-
neiksi, kykenevät sitoutumaan spesifisesti määritettäviin
15 kannabinolimetaboliitteihin sekä keksinnön mukaisiin leima-
ryhmiä sisältäviin leimattuihin yhdisteisiin, kuten alla
tarkemmin kuvataan. Vastaseerumituotteen soveltuvuudesta
voidaan varmistua nopeasti tavanomaisilla kokeilla.

20 Havainnollistavassa toteutusmuodossa kolmen eri kon-
jugaation, jotka oli rakennettu asemasta 9 sidotuista kol-
mesta THC-johdannaisesta, vastaiset anti-THC-vasta-aineet
yhdistettiin keksinnössä käytettäväksi (esimerkki 14). Ko-
rostettakoon kuitenkin toistamiseen, ettei vasta-aineiden
tuotannossa käytettyjen konjugaattien nimenomainen luonne
25 ole kriittinen keksinnön kannalta, kunhan muodostuneet vas-
ta-aineet omaavat vaadittavan laajan spesifisyyden THC-me-
taboliittien suhteen.

30 Vaikka täydellistä vastaseerumia voidaan käyttää,
IgG-fraktio eristetään edullisesti suolafraktioidinnilla, ku-
ten ammoniumsulfaattisaostuksella, DEAE-kromtografialla tai
muulla alalla tunnetulla tavalla.

Osa kyseisen keksinnön mukaisista uusista kannabino-
liyhdisteistä on THC:n valtametaboliitin,

5



10

11-nor- Δ^9 (tai Δ^8)-THC-9-karboksyylihapon, johdannaisia, joissa fenolihydroksyylliryhmä on modifioitu korvaamalla fenolihydroksyyllivety p-aminobentsyylliryhmällä tai aminopäätteisellä alkyylliryhmällä, joka voi sisältää 1-7 hiiliatomia. Käytettäessä aminoalkyylliryhmää alkyylin ketju voi olla suora tai haarautunut, jolloin soveltuvia ryhmiä ovat aminopropyli-, aminoisopropyli-, aminobutyli-, aminoisobutyli- ja muut vastaavat ryhmät.

15

20

Keksinnön mukaisia aminoyhdisteitä ja -välituotteita voidaan käyttää vapaina emäksinä tai niiden orgaanisten happojen tai mineraalihappojen kanssa muodostamien happoadditiosuolojen muodossa. Käytettäviksi soveltuvia tyypillisiä additiosuoloja ovat hydrokloridit, hydrobromidit, sulfonaatit, metaanisulfonaatit, nitraatit, fosfaatit, trifluoriasetaatit, oksalaatit, maleaatit, sukkinaatit, asetaatit ja muut vastaavat suolat.

25

30

Korostettakoon, että nimenomaan liitosketjun saattavillaolo THC:n fenolihydroksyylliryhmässä tuottaa tämän keksinnön mukaisten yhdisteiden erinomaiset diagnostiset ominaisuudet. Alan ammattilainen havaitsee välittömästi, että käyttämällä hyväksi keksinnön mukaisia välituotteita avautuu monia muita teitä samanlaisten liitosketjujen, jotka käsittävät samanlaisia leimaryhmiin sitoutumiseen soveltuvia funktionaalisia ryhmiä, valmistamiseksi.

35

Keksinnön mukaisissa yhdisteissä läsnä olevat funktionaaliset ryhmät muodostavat sopivan kohdan leimaukseen

tarkoituksenmukaisen leimaavan ryhmän kovalenttisella sitomisella, jolloin havaitsemista helpotetaan immuunimäärityksissä.

5 Sopivia leimaryhmiä leimattuja yhdisteitä varten
ovat esim. biotiini (käytettäväksi yhdessä sopivasti leimattun avidiinin kanssa); fluoresoivat, kemiluminoivat tai bioluminoivat ryhmät, tai radioisotoopit, kuten ^3H , ^{14}C , ^{35}S ja ^{125}I , joiden tuottaminen molekyyliin useissa alalla hyvin tunnetuissa muodoissa on helppoa yhdisteissä saatavilla olevien amino- ja karboksyyli-ryhmien ansiosta. Nämä ryhmät voidaan todeta ja kvantitoida tarkoituksenmukaisuuskohdat huomioiden nestetuikespektrometrialla, fluoresenssispektroskopiolla, fluoresenssipolarisaatiolla jne.

15 Vaihtoehtoisesti voidaan valmistaa konjugaattiyhdisteitä, joissa keksinnön mukainen yhdiste on kovalenttisesti sidottu entsyymiin vapaan funktionaalisen ryhmän välityksellä, jolloin sopivia entsyymejä ovat mainittuihin rajoittumatta erilaiset peroksidaasit, glukoosioksidaasi, β -galaktosidaasi ja emäksinen fosfataasi. Erityisen edullinen on piparjuuriperoksidaasi, joka voidaan todeta analysoimalla spektrofotometrisesti sen vaikutus substraattiin kuten pyrogalloliin tai o-fenyleenidiamiiniin. Kun käytetään entsyymejä, konjugaattiyhdisteiden kanssa voidaan käyttää tavanomaisia lisäaineita, puskureita, laimentimia ja entsyymistabilisaattoreita.

25 Tämän keksinnön mukaiset kannabinolijohdannaiset ovat immuunimäärityksiin erinomaisesti soveltuvia reagensseja osittain siksi, että ne käsittävät leimattaviksi soveltuvia funktionaalisia ryhmiä. Oleellisempaa on, että fenolihappisivuketjujen läsnäolon ansiosta muodostuu yhdisteitä, jotka edelleen kykenevät sitoutumaan anti-THC-vasta-aineisiin mutta jotka tekevät tämän alentuneella affiniteetilla. Tämän seurauksena määritysnäytteen sisältämät kannabinolimetaboliitit syrjäyttävät ne helpommin vasta-aineen sitoutumiskeskuksista. Näitä leimattuja yhdisteitä

käyttävät immuunimääritykset ovat täten äärimmäisen herkkiä.

Keksinnön mukaisia anti-THC-vasta-aineita ja leimat-
tuja yhdisteitä voidaan käyttää monenlaisissa immuunimääri-
5 tyksissä kannabinolimetaboliittien toteamiseksi. Kyseinen
immuunimääritys voi olla radioimmuunimääritys joko vapaasta
liuoksesta tai kiinteässä tilassa. Vaihtoehtoisesti voidaan
suorittaa entsymaattisia immuunimäärityksiä, samoin joko
vapaasta liuoksesta tai kiinteässä tilassa. Kiinteätilamää-
10 ritykset voidaan suorittaa käyttämällä kiinteitä partikke-
leja, joihin vasta-aineet on immobilisoitu. Vasta-aineilla
päälystettäviksi soveltuvia partikkeleja ovat esim. latek-
sihelmet, liposomit, erytrosyytit, polyakryyliamidihelmet,
polystyreenihelmet tai mistä tahansa lukuisista muista so-
15 veltuvista polymeereistä valmistetut helmet. Immuunimääri-
tykset voivat olla joko suoria tai epäsuoria, jolloin jäl-
kimmäisessä tapauksessa käytetään toista, anti-THC-vasta-
aineiden vastaista vasta-ainetta.

Keksinnön edullisen muodon mukaan sekoitetaan näyte,
20 jonka epäillänsä sisältävän kannabinolimetaboliitteja, tun-
nettuun määrään keksinnön mukaista leimattua yhdistettä
sekä tunnettuun määrään polystyreenihelmiin adsorboituja
anti-THC-vasta-aineita. Inkuboinnin jälkeen erotetaan si-
toutunut leimattu yhdiste vapaasta leimatusta yhdisteestä,
25 määritetään joko vapaan tai sitoutuneen yhdisteen määrä ja
verrataan sitä arvoihin, jotka on saatu suorittamalla samat
analyysivaiheet tunnetun määrän kannabinolimetaboliittia
sisältäviä näytteitä käyttäen.

Seuraavaksi annetaan esimerkkejä, joissa havainnol-
30 listetaan joidenkin keksinnön mukaisten uusien kannabinoli-
johdannaisten synteesi sekä yhden näistä yhdisteistä käyttö
entsymaattisessa immuunimääritysjärjestelmässä. (trans-
rac)-1-(3-aminopropoksi)-6a,7,10,10a-tetrahydro-6,6-dime-
tyyli-3-pentyyli-6H-dibentso(b,d)pyraani-9-karboksyylihap-
35 pomonohydrokloridin synteessin välituotteiden ja lopputuot-

teen kemialliset rakenteet on esitetty kaaviossa 1 edellä. (trans-rac)-6a,7,10,10a-tetrahydro-1-(4-aminobentsyyli)-6,6-dimetyyli-3-pentyyli-6H-dibentso(b,d)pyraani-9-karboksylihapon synteessin välituotteiden ja lopputuotteen kemialliset rakenteet on esitetty kaaviossa 2. Roomalaiset numerot esimerkkien 1 - 13 otsikoissa viittaavat kaavioissa 1 ja 2 esitettyihin rakennekaavoihin.

Esimerkki 1

10 Etyyli-4-metyyli-5-hydroksi-7-pentyylikumariini-3-propionaatin (I) valmistus

Mekaanisella sekoittajalla, lämpömittarilla ja typenkuplitusputkella varustettuun 5litran kolviin mitattiin 210,1 g (1,17 mol) olivetolia (5-pentyyli-resorsiini, Aldrich), 300,0 g (1,30 mol) dietyyli-2-asetoglutaraattia (Aldrich) ja 180,0 g (1,117 mol) fosforioksidikloridia. Seosta sekoitettiin huoneen lämpötilassa ja se alkoi hitaasti paksuta. Kolmen vuorokauden kuluttua seos oli kiinteytynyt ja sitä seisotettiin edelleen 7 vuorokautta sekoittamatta.

20 Kiinteä seos (väriltään vaalean vihreä) liuotettiin 2,0 litraan metyleenikloridia sekä siirrettiin 6 litran erotussuppiloon. Orgaanista kerrosta pestiin 10 litralla deionisoitua vettä jaettuna viiteen samansuuruiseen annokseen, minkä jälkeen se kuivattiin kidevedettömällä Na_2SO_4 -llä ja haihdutettiin sitten liuotin pois pyöröhaihduttimessa (40 °C, 50 mmHg), mikä tuotti saantona 672,7 g (166 %) vaalean punaista kiinteää ainetta. Tämä kiinteä aine liuotettiin edelleen 1,0 litraan etyyliasetaattia käyttäen höyryhaudetta, minkä jälkeen lisättiin heksaania jatkaen samalla lämmittämistä. Liuoksen annettiin jäähtyä huoneen lämpötilaan ja sijoitettiin se sitten pakastimeen (-10 °C) yöksi. Saadut kiteet suodatettiin käyttäen büchner-suppi-
30 loa, pestiin noin 1 litralla kylmää heksaanietyyyliasetaattiseosta (2:1) sekä kuivattiin vakuumiunissa (100 °C/10 mmHg) 20 tunnin ajan, mikä tuotti saantona 243,5 g (60 %) vaaleita vaalean punaisia kiteitä, sp. 118 - 120 °C.

Esimerkki 27,10-dihydro-1-hydroksi-3-pentyyli-6H-dibentso-
(b,d)pyraani-6,9-(8H)-dionin (II) valmistus

5 Mekaanisella sekoittajalla, lämpömittarilla, lisäys-
suppilolla ja typenkuplitusputkella varustettuun 5 litran
kolviin mitattiin 80,0 g (2,0 mol 60-%:ista NaH:n disper-
siota mineraaliöljyssä (Aldrich). Mineraaliöljy poistettiin
pesemällä dispersiota 1500 ml:lla heksaania (Fisher) jaet-
tuna kolmeen samansuuruiseen erään. Kolviin lisättiin 160
10 g (0,462 mol) yhdistettä I ja kyseiset kaksi kiinteää ai-
netta sekoitettiin toisiinsa mekaanisesti. Kolvin alle ase-
tettiin 20 °C:een vakiolämpötilavesihaude ja lisättiin va-
rovasti tipoittain 1,4 litraa tislattua dimetyylisulfoksi-
dia (DMSO) siten, ettei seoksen lämpötila missään vaiheessa
15 ylittänyt 20 °C:tta.

Kuuden tunnin kuluttua lisäys oli suoritettu ja hau-
de poistettiin. Seosta sekoitettiin vielä tunnin ajan ja se
sijoitettiin sitten yöksi pakastimeen (-10 °C). Seuraavana
päivänä seos lämmitettiin huoneen lämpötilaan ja kaadettiin
20 12 litralla jäävettä ja 250 ml:lla konsentroitua HCl:ää
täytettyyn uuttolaitteeseen sekä sekoitettiin kiivaasti 2
tunnin ajan. Seosta sekoitettaessa alkoi saostua kiinteitä
aineita. Nämä kiinteät aineet otettiin talteen suodattamal-
la büchner-suppilolla sekä pestiin ne 200 ml:lla kyllästet-
tynä NaHCO₃-liuosta ja sitten 250 ml:lla deionisoitua vet-
tä. Kiinteitä aineita kuivattiin ilmalla ja sitten vakuumi-
uunissa (100 °C/1 mmHg) 16 tunnin ajan, mikä tuotti saanto-
na 124,8 g (90 %) lähes valkoista kiinteää ainetta,
sp. 181 - 184 °C.

30 Esimerkki 37,8,9,10-tetrahydro-1-hydroksi-3-pentyyli-6H-
dibentso(b,d)pyraani-9,2-(1'-3')-dioksolan-6-onin (III)
valmistus

35 Lämpömittarilla, mekaanisella sekoittajalla, Dean-
Stark-kerääjällä, palautusjäähdyttäjällä ja typenkuplitus-

putkella varustettuun 3 litran kolviin mitattiin 20,0 g (0,32 mol) etyleeniglykolia, 18,4 g (0,062 mol) yhdistettä II, 1,0 g p-tolueenisulfonihappomonohydraattia ja 1,0 litraa tolueenia. Liuosta palautusjäähdytettiin yön yli ja
5 kerääjään kerääntyi 16,3 ml atseotrooppista vettä. Reaktioseos jäähdytettiin huoneen lämpötilaan ja siirrettiin 2 litran erotussuppiloon, jossa sitä pestiin ensin 300 ml:lla kyllästetty NaHCO₃-liuosta ja sitten 300 ml:lla deionisoitua vettä.

10 Tolueenikerros kuivattiin Na₂SO₄:llä ja haihdutettiin sitten pyöröhaihduttimessa (60 °C/50 mmHg) ruskeaksi öljyksi, joka uudelleenliuotettiin noin 100 ml:aan metyleenikloridia. Liuokseen lisättiin 20 ml heksaania ja seos sijoitettiin yöksi pakastimeen (-10 °C). Muodostui kiteitä, jotka otettiin talteen suodattamalla büchnersuppilolla, pestiin 30 ml:lla heksaania ja kuivattiin yön yli vakuumiolosuhteissa (25 °C/1 mmHg), mikä tuotti 14,7 g (69 %) lähes valkoista kiinteää ainetta, sp. 110 - 113 °C.

Esimerkki 4

20 dl-1-hydroksi-3-pentyyli-6,6-dimetyyli-6a,7-dihydro-6H-dibentso(d,b)pyran-9(8H)-onin (IV) valmistus

Mekaanisella sekoittajalla, lämpömittarilla, lämmitysvaipalla, lisäyssuppilolla, palautusjäähdyttäjällä ja typenkuplitusputkella varustettuun 3 litran kolviin mitattiin 12,5 g (0,515 mol) Mg-lastuja (Fisher) ja 500 ml vedetöntä eetteriä. Sitten suspensioon lisättiin tipoitain 73,1 g (0,515 mol) jodimetaania (Aldrich) sellaisella nopeudella, että kiehuminen pysyi kevyenä. Kun lisäys oli suoritettu (noin 30 minuutin kuluttua), palautusjäähdytettiin harmaanmustaa liuosta vielä tunnin ajan, minkä jälkeen liuokseen lisättiin tipoitain 20 minuutin aikana liuos 16,9 g (0,040 mol) yhdistettä III 300 ml:ssa vedetöntä tetrahydrofuraania palautusjäähdytyksen jatkuessa. Seos muuttui nopeasti keltaiseksi ja kiinteitä aineita kerääntyi kolvin seinämiin.
35

Saatua heterogeenistä seosta palautusjäähdytettiin yön yli ja sitten se jäähdytettiin huoneen lämpötilaan. Reaktio pysäytettiin lisäämällä varovasti 56 ml 1 N HCl:ää noin 20 minuutin aikana ja saatiin kevyesti kiehuva liuos.

5 Lisättiin edelleen 210 ml 6 N HCl:ää 20 minuutin aikana ja sekoitettiin saatua tumman vihreää seosta tunnin ajan sekä siirrettiin se sitten 2 litran erotussuppiloon, josta vesikerros erotettiin pois.

Eetterikerros uutettiin peräkkäin 200 ml:lla deionisoitua vettä, 200 ml:lla kyllästettyä NaHCO₃-liuosta ja 200 ml:lla deionisoitua vettä, minkä jälkeen liuos kuivattiin Na₂SO₄:llä ja haihdutettiin pyöröhaihduttimessa (40 °C/50 mmHg) tumman vihreäksi öljyksi. Lisättiin 50 ml eetteriä ja seoksen annettiin seistä yön yli huoneen lämpötilassa. Muo-

15 dostui kiteitä, jotka otettiin talteen büchner-suppilon avulla, pestiin kahdesti 25 - 50 ml:lla kylmää (-10 °C) eetteri:heksaania (1 :1) ja kuivattiin yön yli vakuumissa (25 °C/1 mmHg), sekä saatiin 9,7 g (63 %) vaalean keltaista ainetta, sp. 198 - 200 °C.

20 Konsentroimalla emäliuos pyöröhaihduttimessa (40 °C/50 mmHg) ja lisäämällä 10 ml eetteriä saatiin lisää kiinteitä aineita, jotka kuivattiin vakuumissa (25 °C/1 mmHg), ja saatiin 1,3 g vaalean vihreää kiinteää ainetta, sp. 193 - 198 °C. Kokonaissaanto oli 71 %.

25 Esimerkki 5

dl-6aβ,7,10,10a-tetrahydro-1-hydroksi-6,6-dimetyyli-3-pentyyli-6H-dibentso(b,d)pyran-9(8H)-onin (V) valmistus

Mekaanisella sekoittajalla, kuivajälauhduttimella, lisäyssuppilolla ja kaasuiuventtiilillä varustettuun 2 litran vaipalliseen hartsikolviin mitattiin 1,5 litraa nestemäistä NH₃:a ja lisättiin 0,15 g Li-lankaa (Alfa), mikä muutti liuoksen siniseksi. 3 minuutin kuluttua lisättiin tipoitain liuosta, jossa oli 32,0 g (0,102 mol) yh-

35 distettä IV 500 ml:ssa kuivaa THF:ää, kunnes sininen väri

vaaleni. Tätä menettely toistettiin, kunnes oli lisätty kaikkiaan 2,7 g (0,39 gramma-atomia) Li-lankaa ja yhdiste IV oli kokonaisuudessaan lisätty (noin 2 tuntia). Sinistä liuosta sekoitettiin 15 minuutin ajan $-33\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa, minkä jälkeen reaktio pysäytettiin 150 ml:lla kyllästettyä NH_4Cl -liuosta, joka lisättiin varovasti 10 minuutin aikana.

NH_3 :n annettiin haihtua nopeasti (noin 2,5 tunnin aikana), minkä jälkeen lisättiin 500 ml deionisoitua vettä. Liuoksen pH säädettiin 12:sta yhteen lisäämällä varovasti (noin 2 tunnin aikana) 800 ml konsentroitua HCl :ää. Liuos uutettiin 1,5 litralla metyleenikloridia jaettuna kolmeen samansuuruiseen erään, minkä jälkeen orgaaninen faasi kuivattiin Na_2SO_4 :llä ja haihdutettiin pyöröhaihduttimessa ($40\text{ }^{\circ}\text{C}/50\text{ mmHg}$) keltaiseksi, öljymäiseksi kiinteäksi aineeksi.

Kiinteä aine liuotettiin takaisin noin 100 ml:aan kloroformia käyttäen höyryhaudetta, ja lisättiin 500 ml heksaania. Liuosta konsentroititiin pyöröhaihduttimessa ($35\text{ }^{\circ}\text{C}/50\text{ mmHg}$), kunnes tislettä oli kerätty noin 200 ml. Alkoi muodostua kiteitä ja seoksen annettiin seistä yön yli huoneen lämpötilassa, minkä jälkeen kiinteät aineet otettiin talteen büchner-suppilolla suodattamalla sekä pestiin ne 1,5 litralla lämmintä ($50\text{ }^{\circ}\text{C}$) heksaania jaettuna kolmeen samansuuruiseen erään.

Pestyjä kiinteitä aineita kuivattiin yön yli vakuumiuunissa ($25\text{ }^{\circ}\text{C}/1\text{ mmHg}$), mitä tuotti 27 g (84 %) lähes valkoista kiinteää ainetta, sp. $161 - 164\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ohutkerroskromatografia-ajossa heksaani:EtOAc:llä (3:1) vertaaminen autenttisiin standardinäytteisiin osoitti kiinteän aineen koostuvan pääasiallisesti yhdisteestä V pienen määrä cisisomeeriä ollessa läsnä epäpuhtautena. Aine puhdistettiin jommalla kummalla kahdesta menetelmästä.

Ensimmäisessä puhdistusmenetelmässä käytettiin korkeapainenestekromatografia- (HPLC-) Magnum 70 -kolonnia, joka oli pakattu Partisil 40 -piidioksidilla, ja liikkuvana faasina heksaani:EtOAc:tä (4:1). Kolonniin ruiskutettiin 15

- 20 g:n näyte ja kerättiin 500 ml:n suuruisia fraktioita, jolloin käytetty liikkuvan faasin kokonaismäärä oli 8,5 litraa. Tällä menettelyllä 72,1 g cis/trans-seosta erotettiin puhtaiksi aineosikseen, jolloin trans-yhdisteen V saanto oli 55,1 g (76 %), sp. 163 - 165 °C, ja vastaavan cisyhdisteen 10,3 g (14 %), sp. 145 - 148 °C.

Vaihtoehtoisessa menettelyssä suoritettiin isomerointi koko seoksen isomeroimiseksi trans-yhdisteeksi V. Mekaanisella sekoittajalla, lämpömittarilla ja typenkuplitusputkella varustettuun 500 ml:n kolviin mitattiin 11,9 g (0,037 mol) em. kiinteää ainetta liuotettuna 250 ml:aan metyleenikloridia ja jäädytettynä -10 °C:seen (jää-suola-
haude). Liuokseen lisättiin 17,3 g (0,129 mol) AlCl₃:a, mikä nosti reaktioseoksen lämpötilan -5 °C:seen. Suspensiota sekoitettiin -5 °C: ± 5 °C:ssa viiden tunnin ajan ja se kaadettiin sitten noin 500 ml:aan jäävettä sekä siirrettiin erotussuppiloon, jossa faasien annettiin erottua.

Metyleenikloridikerros kuivattiin kidevedettömällä Na₂SO₄:llä ja konsentroidtiin pyöröhaihduttimessa (40 °C/50 mmHg) lähes valkoiseksi kiinteäksi aineeksi, joka suspendoitiin 500 ml:aan heksaania, minkä jälkeen suspensiota kuumennettiin palautusjäähdyttären höyryhauteessa 15 minuutin ajan. Lämmin suspensio suodatettiin büchner-suppilolla, pestiin noin 100 ml:lla kiehuvaa heksaania ja kuivattiin vakuumiuunissa (25 °C/10 mmHg) yön yli, mikä tuotti saantona 9,5 g (80 %) valkeaa, kiinteää yhdistettä V, sp. 161 - 166,5 °C.

Esimerkki 6

(Trans-rac)-6a,7,8,9,10,10a-heksahydro-1,9-dihydroksi-6,6-dimetyyli-3-pentyyli-6H-dibentso(b,d)pyraani-9-karbonitriilin (VI) valmistus.

Lisättiin liuos, jossa oli 5 g (0,0158 mol) yhdistettä V 175 ml:ssa metanolia, suspensioon, jossa oli 5 g (0,102 mol) natriumsyanidia 20 ml:ssa metanolia, ja sekoitettiin saatua seosta huoneen lämpötilassa typpi-ilmakehäs-

sä 2 tunnin ajan. Seokseen lisättiin liuos, jossa oli 5,75 ml jäätikkää 50 ml:ssa metanolia, ja jatkettiin sekoitusta 30 minuutin ajan. Seoksen pH säädettiin noin 2:een vedettömällä HCl:llä ja seosta sekoitettiin yön yli typpi-ilmakammissa.

Liutotin tislattiin pois yhdessä tunnissa käyttäen 40 °C:eista vesihaudetta ja imua, minkä jälkeen jäännös ositettiin 75 ml:aan vettä ja 100 ml:aan metyleenikloridia. Vesikerros uutettiin vielä 100 ml:lla metyleenikloridia, minkä jälkeen yhdistetyt orgaaniset kerrokset kuivattiin kidevedettömällä Na₂SO₄:llä ja haihdutettiin pyöröhaihduttimessa (40 °C/20 mmHg) kuiviin. Kuivausta jatkettiin 0,5 tunnin ajan 0,5 mmHg:n paineessa ja saatiin 5,5 g (100 %) yhdistettä VI vaalean keltaisena vaahtona. Tätä materiaalia käytettiin ilman jatkopuhdistusta yhdisteen VII valmistamiseksi, vaikkakin analyysinäyte uudelleenkitetyttiin metyleenikloridi/ petrolieetteristä (1:10), jolloin saatiin värittömiä neulasia, sp. 131 - 133 °C.

Esimerkki 7

(trans-rac)-6a,7,8,9,10,10a-heksahydro-1,9-dihydroksi-6,6-dimetyyli-3-pentyyli-6H-dibentso(b,d)-pyraani-9-karboksyylihapon metyyliesterin (VII) valmistus

Käsiteltiin sekoitettua liuosta, jossa oli 5,5 g (0,0160 mol) yhdistettä VI 150 ml:ssa metanolia, kuplittamalla siihen vedetöntä HCl:ää 3 °C:ssa jäähauteessa 1,25 tunnin ajan kyllästymispisteeseen asti. Kolvi peitettiin väliseinällä ja sitä pidettiin -20 °C:ssa 48 tunnin ajan, minkä jälkeen lisättiin 75 ml 6 N HCl:n vesiliuosta. Seos haihdutettiin pyöröhaihduttimessa (35 °C/20 mmHg) ja sitten 0,5 mmHg:n paineessa, jolloin saatiin öljyä.

Saatu öljy suspendoitiin 150 ml:aan 50-%:ista metanolin vesiliuosta ja seoksen annettiin seistä yön yli 25 °C:ssa. Muodostui runsas valkea sakka, joka otettiin talteen suodattamalla ja liuotettiin sitten 250 ml:aan etyyliasetaattia. Seoksesta erotettiin läsnä ollut pieni

määrä vettä, kuivattiin orgaaninen kerros kidevedettömällä Na_2SO_4 :llä ja haihdutettiin se sitten kuiviin vakuuissa (30 °C/20 mmHg).

5 Jäänöstä hierottiin 50 ml:lla petrolieetteriä (kp. 30 - 60 °C). Kiinteä aines otettiin suodattamalla talteen, pestiin 50 ml:lla petrolieetteriä jaettuna kahteen saman-
suuruiseen annokseen ja kuivattiin vakuuissa (40 °C, 0,5 mmHg) 2 tunnin ajan, jolloin saatiin 3,1 g (53 %) väritöntä
10 kiinteää ainetta, sp. 178 - 180 °C. Emäliuokset haihdutettiin ja saatiin 1,3 g (22,5 %) keltaisena öljynä, joka NMR-analyysissä osoittautui yhdisteen VII epimeeriseksi hydroksiesteriksi. Kokonaissaanto oli täten 75 %.

Esimerkki 8

15 (trans-rac)-6a,7,10,10a-tetrahydro-1-hydroksi-6,6-dimetyyli-3-pentyyli-6H-dibentso(b,d)pyraani-9-karboksylihapon metyyliesterin (VIII) valmistus

Typen kuplitusputkella ja magneettisekoittajalla varustettuun 50 ml:n reaktiopulloon mitattiin 1,4 g (0,0037 mol) yhdistettä VII, 10 ml pyridiiniä ja 2,0 ml tionyyli-
20 kloridia ja sekoitettiin sitten saatua seosta huoneen lämpötilassa typpi-ilmakehässä tunnin ajan. Reaktio pysäytettiin kaatamalla seos 30 ml:aan jäävettä ja sitten uutettiin 90 ml:lla etyyliasetaattia jaettuna kolmeen samansuuruiseen annokseen.

25 Orgaaninen kerros kuivattiin kidevedettömällä Na_2SO_4 :llä ja haihdutettiin kuiviin vakuuissa (25 °C, 1 mmHg), mikä tuotti saantona 1,2 g kiinteää vaahtoa. Tätä vaahtoa hierottiin 30 ml:lla petrolieetteriä (30 - 60 °C), mikä tuotti 975 mg (73 %) vaalean keltaista kiinteää ainetta,
30 sp. 107 - 110 °C. Analyysinäyte uudelleenkiteytettiin eetteri-heksaanista (1:6), jolloin, saatiin värittömiä kiteitä, sp. 139 - 141 °C.

Esimerkki 9

(trans-rac)-1-(3-aminopropoksi)-6a,7,10,10a-tetrahydro-6,6-dimetyyli-3-pentyyli-6H-dibentso(b,d)pyraani-9-karboksylihappo monohydrokloridin (IX) valmistus

5 358 mg (0,001 mol) yhdistettä VIII lisättiin suspensioon, jossa oli 60 mg (0,0015 mol) natriumhydridiä (Aldrich, 60-%:inen mineraaliöljyssä, esipesty heksaanilla) 3,0 ml:ssa N,N-dimetyyliformamidia (DMF), ja seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa typpi-ilmakehässä 30 minuutin
10 ajan. Sitten lisättiin 560 mg (0,00021 mol) N-3-bromipropyyliiftaali-imidiä ja saatiin ruskea liuos, jota sekoitettiin typpi-ilmakehässä 3 tunnin ajan.

Seos kaadettiin 20 ml:aan jäävettä ja sitä uutettiin 40 ml:lla etyyliasetaattia jaettuna kahteen samansuuruiseen
15 annokseen. Orgaaniset kerrokset kuivattiin kidevedettömällä Na₂SO₄:llä ja haihdutettiin vakuuissa (25 °C, 1 mmHg), mikä tuotti saantona 740 mg keltaista öljyä. Öljy liuotettiin 10 ml:aan heksaani:etyyliasettaattia (7:3) ja puhdistettiin
20 kolonnikromatografialla käyttäen 28 g:lla silikageeliä täytettyä kolonnia, joka oli esipakattu heksaani:etyyliasettaattiin (7:3). Kerättiin 200 ml:n fraktioita, joista TLC:n silikageelissä perusteella haluttua tuotetta sisältävät
haihdutettiin vakuuissa (25 °C, 1 mmHg) 332 mg:ksi (57,9 %)
väritöntä vaahtoa.

25 Vaahto liuotettiin kokonaisuudessaan 10 ml:aan metyyliamiinin 15-%:ista liuosta metanolissa, saatua liuosta sekoitettiin typpi-ilmakehässä huoneen lämpötilassa tunnin
ajan ja haihdutettiin sitten kuiviin vakuuissa (25 °C, 1 mmHg). Jäännös liuotettiin seokseen, jossa oli 10 ml 2 N
30 NaOH-liuosta ja 10 ml metanolia, ja saatua seosta sekoitettiin typpi-ilmakehässä yön yli. Seos haihdutettiin sitten lähes kuiviin vakuuissa (25 °C, 50 mmHg), se tehtiin hap-
pamaksi 6 N HCl:llä pH 2:een ja uutettiin 20 ml:lla etyyliasettaattia jaettuna kahteen samansuuruiseen annokseen.
35 Orgaaniset kerrokset kuivattiin kidevedettömällä Na₂SO₄:llä

ja haihdutettiin kuiviin vakuuissa (25 °C, 1 mmHg) sekä hierottiin jäännöstä eetterillä, mikä tuotti saantona 90 mg (35 %) väritöntä kiinteää ainetta, sp. 255 - 257 °C.

Esimerkki 10

5 (trans-rac)-9-hydroksi-6a,7,8,9,10,10a-heksa-hydro-
1-(4-nitrobentsyyli)-6,6-dimetyyli-3-pentyyli-6H-dibentso-
(b,d)pyraani-9-karboksyylihapon metyyliesterin (X) valmis-
tus

10 Liuosta, jossa oli 3,80 g (0,01 mol) yhdistettä VII
(katso esimerkki 8) 150 ml:ssa asetonia, sekoitettiin ar-
gonilmakehässä 500 ml:n kolmikaulakolvissa, samalla kun
lisättiin 2,25 g (0,01 mol) p-nitrobentsyylibromidia. Li-
sättiin 7 g (0,05 mol) hienojakoiseksi jauhettua kidevede-
15 töntä K₂CO₃:a ja saatua suspensiota sekoitettiin kiivaasti
argonilmakehässä 18 tunnin ajan 25 °C:ssa. Ohutkerroskroma-
tografia- (TLC-) analyyysi silikageelilevyillä 10 %
CeSO₄/H₂SO₄ sisältävällä heksaani-etyyliasetaatilla (7:3)
eluoiden ja tehden yhdisteet näkyviksi sumuttamalla 10 %
fosfomolybdiinihappo/etanolilla ja kuumentamalla osoitti
20 reaktion menneen loppuun.

Seos suodatettiin ja jäännös haihdutettiin vakuuissa
keltaiseksi öljyksi. Tämä öljy liuotettiin 5 ml:aan eetteriä
ja liuos kaadettiin 30 g:n kerrokselle silikageeliä
(70 - 230 mesh, E. Merck) lasisintterisuppilossa. Kerros
25 eluointiin sitten 400 ml:lla eetteriä, otettiin liuotin tal-
teen ja haihdutettiin kuiviin pyöröhaihduttimessa 30 °C:-
ssa.

Jäännöksen kiteytyys eetteri-heksaanista (1:5) tuotti
4,7 g kuohkeaa valkeaa kiinteää ainetta, sp. 120 - 123 °C.

30 Esimerkki 11

(trans-rac)-6a,7,10,10a-tetrahydro-1-(4-nitrobutyy-
li-6,6-dimetyyli-3-pentyyli-6H-dibentso(b,d)pyraani-9-kar-
boksyylihapon metyyliesterin (XI) valmistus

35 Seosta, joka sisälsi 2,5 g (0,00488 mol) yhdistettä
X, 15 ml pyridiiniä ja 7,75 g (0,05075 mol) POCl₃:a, sekoi-

tettiin huoneen lämpötilassa argonilmakehässä 2 tunnin ajan. Seos kaadettiin sitten 100 ml:aan murskattua jätää ja uutettiin kahdella 100 ml:n tilavuudella CH_2Cl_2 :ta. Orgaaninen kerros kuivattiin Na_2SO_4 :llä, suodatettiin ja haihdutettiin kuiviin. Jäännös liuotettiin 30 ml:aan CH_2Cl_2 :ta ja suodatettiin 20 g:n kerroksella silikageeliä (70 - 230 mesh). Kerros eluoiitiin 100 ml:lla 1:1 heksaani-eetteriä ja eluaatti haihdutettiin kuiviin pyöröhaihduttimessa 30 °C:ssa.

10 Hierottuna 50 ml:lla petrolieetteriä jäännös tuotti kahtena saantona 1,65 g (68 %) värittömiä prismakiteitä, sp. 165 - 167 °C.

Esimerkki 12

15 (trans-rac)-6a,7,10,10a-tetrahydro-1-(4-aminobent-
syyli)-6,6-dimetyyli-3-pentyyli-6H-dibentso(b,d)-pyraani-
9-karboksyylihapon metyyliesterin (XII) valmistus

20 Seosta, joka sisälsi 1,65 g (0,003 mol) yhdistettä XI, 50 ml CH_2Cl_2 :ta, 100 ml etanolia ja 3,4 g 85-%:ista hydratsiinihydraattia (Aldrich), sekoitettiin kiivaasti lietteenä. Lisättiin yhtenä annoksena 500 mg teknisen puhtausasteen Raney-nikkeliä (esihuuhdottu kolmella 5 ml:n tilavuudella etanolia) etanolissa. Seosta sekoitettiin kiivaasti huoneen lämpötilassa tunnin ajan, minkä jälkeen katalyytti poistettiin suodattamalla Celite-kerroksen läpi.

25 Kerros huuhdottiin kolmella 25 ml:n tilavuudella sekä CH_2Cl_2 :ta että etanolia ja yhdistetyt suodokset haihdutettiin pyöröhaihduttimessa (40 °C, 5 mmHg).

30 Jäännös liuotettiin 25 ml:aan CH_2Cl_2 :ta, kaadettiin 25 g:n kerrokselle silikageeliä (70 - 230 mesh, E. Merck) ja eluoiitiin 300 ml:lla heksaani-etyyliasettaattia (1:1). Yhdistetty eluaatti haihdutettiin pyöröhaihduttimessa (40 °C, 5 mmHg) 1,5 g:ksi keltaista puolikiinteää ainetta. Tätä raakatuotetta edelleenpuhdistettiin kuten edellä kuvattu ja uudelleenkiteytettiin sitten heksaani-eetteristä. Saatiin

35 956 mg:n (62 %) saanto vaalean keltaista kiinteää ainetta, sp. 112 - 114 °C.

Esimerkki 13

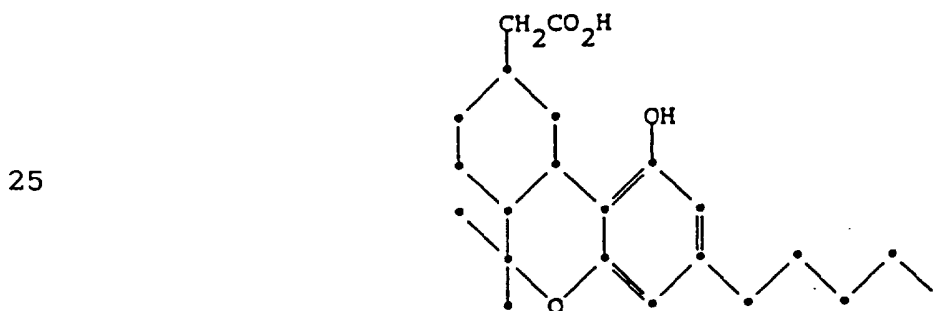
(trans-rac)-6a,7,10,10a-tetrahydro-1-(4-aminobent-
syyli)-6,6-dimetyyli-3-pentyyli-6H-dibentso(b,d)-pyraani-
9-karboksyylihapon (XIII) valmistus

5 Seosta, joka sisälsi 110 mg (0,22 mol) yhdistettä
 XII, 10 ml 2 N NaOH-liuosta ja 25 ml etanolia, kuumennet-
 tiin palautusjäähdyttären argonilmakehässä tunnin ajan.
 Seosta haihdutettiin pyöröhaihduttimessa (30 °C, 0,5 mmHg)
 suurimman osan etanolista poistamiseksi, jolloin tilavuu-
 10 deksi tuli noin 15 ml. pH säädettiin 2:een 6 N HCl:llä ja
 Seos uutettiin kahdella 30 ml:n tilavuudella CH₂Cl₂:ta. Or-
 gaaninen kerros kuivattiin Na₂SO₄:llä ja haihdutettiin sit-
 ten (30 °C, 10 mmHg), mikä tuotti saannoksi 105 mg ruskeaa
 vaahtoa. Amorfista aminohappoa ei onnistuttu kiteyttämään,
 15 mutta 400 MHz:n NMR-, IR- ja massaspektrometrianalyyseissä
 saatiin oletetun rakenteen mukaisia tuloksia ja tuote os-
 oittautui niissä oleellisesti homogeeniseksi.

Esimerkki 14

Anti-THC-vastaseerumin valmistus

20 100 mg kannabinolijohdannaista, jonka kaava on

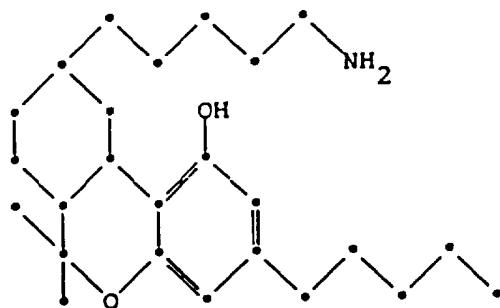


30 liuotettiin 20 ml:aan 30-%:ista metanolia, pH 4,5. Tähän
 liuokseen lisättiin 84 mg 1-(3-dimetyyliaminopropyli)-3-
 etyylikarbodi-imidihiydrokloridia ja pH säädettiin 4,5:een.
 30 minuutin sekoituksen huoneen lämpötilassa jälkeen lisät-
 tiin 100 mg metyloitua nautaseerumialbumiinia 20 ml:ssa
 vettä samalla sekoittaen ja pH säädettiin jälleen 4,5:een.
 35 Liuosta sekoitettiin tunnin ajan huoneen lämpötilassa ja

sitten yön yli 4 °C:ssa, minkä jälkeen mahdollinen konju-
goitumaton kannabinolijohdannainen poistettiin dialysoi-
malla 1000 ml:n tilavuuseriä vastaan natriumfosfaattipusku-
ria 4 °C:ssä jolloin saatiin HC:n ja metyloidun albumiinin
5 konjugaatti.

Yhdistettiin 100 mg lipopolysakkaridia (LPS, mik-
robiaalinen lähde) 5 ml:ssa vettä ja 1 ml 1,0 M NaIO₄:ää ja
annettiin jälkimmäisen vaikuttaa edelliseen 2 tunnin ajan
huoneen lämpötilassa pimeässä. Lisättiin 1 ml etyleenigly-
10 kolia ja seosta sekoitettiin edelleen 30 minuutin ajan hu-
oneen lämpötilassa. Aktivoitu lipopolysakkaridi kaadettiin
vedellä tasapainotettuun Sephadex[®] G-25 -kolonniin, ja
otettiin talteen samaa effluenttifraktio.

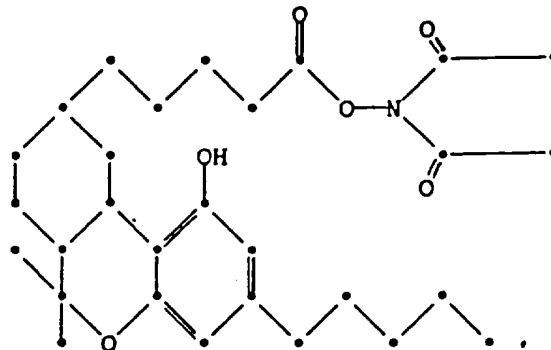
Aktivoituun LPS-effluenttiin lisättiin 5 ml tetra-
15 hydrofuraania, joka sisälsi 38,75 mg kannabinolijohdannais-
ta, jonka kaava on



20 ja seosta inkuboitiin 18 tunnin ajan 22 °C:ssa pimeässä.
Lisättiin 2 ml liuosta, jossa oli 4,5 mg NaBH₄/1 ml vettä,
ja inkuboiin seosta 30 minuuttia huoneen lämpötilassa.
Konjugoimatta jäänyt THC-johdannainen poistettiin dialysoi-
malla päivän ajan tiheästi vaihdettuja vesitilavuuksia vas-
25 taan ja 2 päivän ajan 0,1 M etikkahappoa vastaan, pH 3,5,
ja saatiin THC-LPS-konjugaatti.

30 Liuotettiin 100 mg humaani-IgG:tä 7 ml:aan 0,2 M
NaHCO₃-liuosta, pH 9,6, ja lisättiin 2 ml:ssa dioksaania
108 mg kannabinolijohdannaisista, jonka kaava on

5



10 Lisättiin vielä 9 ml dioksaania ja sekoitettiin seosta 4 °C:ssa ajoittain 4 tunnin aikana, minkä jälkeen lisätiin 180 ml kylmää asetonia. Seosta sentrifugoitiin 10 minuutin ajan 2000 g:ssa ja saatu pelletti pestiin kerran 20 ml:lla kylmää asetonia. 10 minuutin sentrifugoinnin 2000 g:ssa

15 jälkeen pelletti uudelleensuspendoitiin 10 ml:aan fosfaatilla puskuroitua keittosuolaliuosta (PBS). Dialysoitiin 3 päivän ajan 4 °C:ssa kahdesti päivässä vaihdettuja 1000 ml:n PBS-tilavuuksia vastaan ja saatiin THC-humaani-IgG-konjugaatti.

20 Ruiskutettiin Uuden Seelannin valkoisiin kaniineihin lihaksensisäisesti neljän kainalokuopan alueelle 200 µg THC:tä jompana kumpana edellä esitetyistä konjugaateista 1 ml:ssa Freundin täydellistä tehostetta. Tehosteruiskeet, jotka sisälsivät 100 µg samoja konjugaatteja, annettiin 2

25 viikon kuluttua 1 ml:ssa Freundin täydellistä tehostetta ja kerättiin vastaseerumi talteen korvalaskimoista 4 viikon kulutta.

Käytetyistä kolmesta kaniinista saadut hyväksyttävät anti-THC-vastaseerumierät yhdistettiin käytettäväksi kuten alla on kuvattu.

30

Esimerkki 15

Anti-THC-IgG:n puhdistus

Lisättiin hitaasti tipoittain 10 ml kyllästettyä ammoniumsulfaattiliuosta 20 ml:aan anti-THC-vastaseerumia sekoittaen samalla keskeytyksettä 23 °C:ssa. Aluksi muodostui

35

valkea sakka, jonka annettiin liueta uudelleen ennen ammoniumsulfaatin lisäämisen jatkamista. Kun ammoniumsulfaattiliuoksesta oli lisätty noin 6 ml, sakka jäi pysyväksi, minkä jälkeen hidasta tipoittaista lisäämistä jatkettiin keskeytyksettä. Kun loputkin ammoniumsulfaattiliuoksesta oli lisätty, suspension sekoitusta jatkettiin 2 tuntia huoneen lämpötilassa, minkä jälkeen seosta sentrifugoitiin 1500 g:ssa 30 minuutin ajan huoneen lämpötilassa. Tällä menettelyllä suurin osa IgG:stä saadaan pellettiin.

Sentrifugoinnin jälkeen dekantointiin supernatantti ja uudelleenliuotettiin pelletti lisäämällä TRIS/keittosuolaliuosta (koostumus) lopputilavuuteen 20 ml. IgG saostettiin liuoksesta toistamalla edellä kuvatut ammoniumsulfaattilisäys- ja sentrifugointivaiheet, joiden suorituksen jälkeen supernatantti dekantointiin jälleen. Pelletti liuotettiin 10 ml:aan 0,02 M Tris/keittosuolaliuosta, pH 7,5, joka sisälsi 0,01 % timerosaalia (natriumetyylielohopea(2)-tiosalisylaattia) .

Ammoniumsulfaatin poistamiseksi IgG:n sisältävästä liuoksesta dialysoitiin yön yli 4 °C:ssa käyttäen kolme 2 litran tilavuutta 0,02 M Tris/keittosuolaliuosta. Dialyysipussin sisältämän materiaalin tilavuus nostettiin 20 ml:n lopputilavuuteen lisäämällä 0,02 M Tris/keittosuolaliuosta. Tätä liuosta sentrifugoitiin 2000 g:ssa 30 minuutin ajan 4 °C:ssa ja heitettiin saatu pieni pelletti pois. IgG:n sisältävän loppuliuoksen proteiinipitoisuus määritettiin sitten spektrofotometrisesti 280 nm:n aallonpituudella noin 5,3 mg:ksi/ml.

Esimerkki 16

30 Anti-THC-helmien valmistus

4 litran vakuumikolvi täytettiin 2500 ml:n merkki-
viivaan asti 0,63 cm:n 1/4 tuuman himmeillä polystyreeni-
helmillä (Clifton Plastics, Inc., Clifton Heights, PA) ja
lisättiin samalla sekoittaen 2500 ml 95-%:ista etanolia.
35 Kolvi sijoitettiin vakuumiin (1 mmHg) 30 minuutiksi huoneen

lämpötilassa ja etanoli dekantoiitiin. Etanolilisäys-, va-
kuumikäsitteily ja dekantointivaiheet toistettiin vielä kah-
desti, minkä jälkeen helmet suspendoitiin 3 litraan deioni-
soitua vettä. Vesi dekantoiitiin ja helmet pestiin vielä
5 kahdesti samalla tavalla 3 litran erillä deionisoitua vet-
tä. Helmille, joista neste oli dekantoiitu pois, kaadettiin
sitten 2 litraa deionisoitua vettä ja seoksen annettiin
seistä huoneen lämpötilassa yön yli. Pesumenettelyn eri
vaiheita suoritettaessa on tärkeää, ettei helmiä päästetä
10 missään vaiheessa kuivamaan.

Pestyjen helmien päällystämiseksi THC:n vastaisilla
vasta-aineilla edellä kuvattua anti-THC-IgG-liuosta laimen-
nettiin 50 mM:n natriumboraattipuskurilla, pH 8,0, (päällyst-
tettävä liuos) siten, että lopulliseksi proteiinipitoisuu-
15 deksi tuli 25 µg/ml. Helmet päällystettiin lisäämällä 143
ml (tarpeeksi peittämään helmet) päällystävää liuosta mi-
tattuun 250 ml:n tilavuuteen laskeutuneita helmiä (noin
1000 kpl), joista vesi oli dekantoiitu pois, ja antamalla
seoksen seistä 18 - 24 tuntia 18 - 26 °C:ssa.

Päällystämismenettelyn jälkeen päällystävä liuos de-
kantoiitiin ja heitettiin pois ja helmet pestiin kolmeen
kertaan 4 °C:ssa 500 ml:n tilavuuksilla pesupuskuria, joka
sisälsi 0,01 M natriumfosfaattia 0,15 M keittosuolaliuok-
20 sessa ja lisäksi 0,01 % timerosaalia, pH 7,2. Kullakin ker-
ralla helmet suspendoitiin perusteellisesti pesuliuokseen
sekoittamalla, ja liuos dekantoiitiin, kun helmet olivat
laskeutuneet. Koko menettelyn ajan kiinnitettiin huomiota
siihen, ettei helmiä päästetty kuivamaan.

Seuraavaksi helmiä käsiteltiin kyllästymättömien
keskuksetien salpaamiseksi käyttäen jompaa kumpaa kahdesta
30 menettelystä. Seuraavia menettelyitä suoritettaessa helmiä
käsiteltiin vain muovisilla tai lasisilla työvälineillä.

250 ml:n laskeutunutta tilavuutta (noin 1000 helmeä)
edellä saatuja pestyjä THC:n vasta-aineella päällystettyjä
35 helmiä käsiteltiin dekantoinnin jälkeen noin 143 ml:lla

(tarpeeksi peittämään helmet) 45 °C:eista salpauspuskuria, joka sisälsi 100 mM:isessa natriumfosfaatissa 1,0 % nautaseerumialbumiinia (BSA) sekä 0,05 % timerosaalia, pH 6,8, 18 - 24 tunnin ajan. Salpauspuskurikäsitteilyn jälkeen helmet pestiin kolmasti 500 ml:n erillä tuoretta 4 °C:eista salpauspuskuria. Kullakin kerralla helmet suspendoitiin puskuriin sekoittamalla ja niiden annettiin sitten laskeutua, minkä jälkeen puskuri dekantoiitiin pois. Säilytystä silmälläpitäen lisättiin riittävä määrä salpauspuskuria helmien peittämiseksi ja säilytettiin helmet 4 °C:ssa käyttöön asti.

Edellä kuvatut menettelyt voidaan luonnollisesti suorittaa käyttäen suurempia määriä, kunhan helmiä ja liuoksia käytetään samoissa suhteissa.

Esimerkki 17

THC-johdannainen-peroksidaasikonjugaattien valmistus

Aktivoitiin 10 mg piparjuuriperoksidaasia [Boehringer, Mannheim tai Seravac (Pel Freeze)] konjugointia silmälläpitäen liuottamalla kyseinen määrä 3 ml:aan deionisoitua vettä ja sekoittamalla tunnin ajan pimeässä huoneen lämpötilassa. Edellä mainittuun liuokseen lisättiin 0,5 ml 0,1 M natriummetaperjodaattia (natriumperjodaatti) hitaasti 20 minuutin aikana samalla sekoittaen pimeässä tilassa huoneen lämpötilassa. Natriumperjodaattiliuos valmistettiin tuoreena juuri ennen käyttöä ja aktivointireaktio pysäytettiin lisäämällä 0,5 ml 0,5 M etyleeniglykolia, joka oli jäähdytetty 4 - 8 °C:eiseksi .

Seos siirrettiin välittömästi dialyysiletkuun (Spectrapor, molekyylipainoväli 12000 - 14000) ja sitä dialysoitiin yön yli 4 °C:ssa kolmasti vaihdettua 1 litran 0,01 M natriumasetaatipuskuritilavuutta, pH 5,5, vastaan. Dialyysin päätyttyä pussin sisältämä materiaali (tilavuus 4,0 ml) sijoitettiin 10 ml:n Wheaton-meripihkaampulliin.

Konjugaatioreaktion suorittamiseksi lisättiin ti-
poittain ja samalla sekoittaen 4 ml etanolin ja 0,4 M nat-

riumasetaattipuskurin, pH 5,5, 1:1-seosta, joka sisälsi noin 0,56 mg (trans-rac)-1-(3-aminopropoksi)-6a,7,10,10a-tetrahydro-6,6-dimetyyli-3-pentyyli-6H-dibentso(b,d)pyraani-9-karboksyylihappomonohydrokloridia (yhdiste IX, katso kuvio 1 ja esimerkki 9, supra), aktivoituun peroksidaasiliuokseen ja annettiin seoksen reagoida 2 tunnin ajan huoneen lämpötilassa pimeässä.

Muodostuneiden Schiffin emäksien stabiloimiseksi peroksidaasikonjugaatioliuokseen lisättiin 1 ml 0,1 M natriumsyaaniboorihydridiä ja seosta sekoitettiin 2 tuntia huoneen lämpötilassa pimeässä.

Stabiloitu konjugaatioreaktioseos jaettiin sitten neljään samansuuruiseen osaan ja kaadettiin erät neljään Pharmacia PD-10 -kolonniin, jotka oli edeltäpäin tasapainotettu puskurilla, joka sisälsi 0,2 M natriumfosfaattia, pH 6,8 (kromatografiapuskuri). Lisätyt erät ajettiin kolonnikerroksien yläosaan ja päälle lisättiin 4 ml kromatografiapuskuria.

Kustakin kolonnista kerättiin tilavuudeltaan noin 12,4 ml:n suuruiset kolonnieluaatit. Spektrofotometrinen analyysi 403 nm:n aallonpituudella osoitti konjugoituneen peroksidaasin saannoksi noin 66 %, kun oletettiin ekstinktiokertoimen arvoksi 2,3.

5 ml:n erät konjugaattieluaattiliuoksia laimennettiin 0,2 M natriumfosfaattipuskurilla, pH 6,8, (laimennettu THC-peroksidaasikonjugaattireagenssi) käytettäväksi kuten alla kuvattu.

Esimerkki 18

Entsymaattisen THC-immuunimäärityksen määritysprotokolla

Valmistettiin sarja 11 x 75 mm:n polystyreenikoeputkia näiden sisältäessä kahdenkertaisina määrityksinä 50 µl:n tilavuudet analysoitavia virtsanäytteitä, normaali-kontrollivirtsanäytteitä tai THC-standardin sisältäviä virtsanäytteitä. Standardi- ja normaalikontrollinäytteet

otettiin normaalivirtsanäytteistä, jotka sisälsivät 0,50, 100, 200 tai 500 ng/ml lisättyä 9-karboksi-11-nor- Δ^9 -tetrahydrokannabinolia (100 $\mu\text{g/ml}$ absoluuttisessa etanolissa, Research Triangle Institute, Research Triangle Park, NC).

5 Kuhunkin putkeen lisättiin 250 μl laimennettua THC-peroksidiasikonjugaattireagenssia ja ravisteltiin putkia. Sitten kuhunkin putkeen lisättiin yksi anti-THC-helmi, sekoitettiin putkien sisältö ja inkuboitiin niitä i 30 minuutin ajan huoneen lämpötilassa.

10 Inkuboinnin päätyttyä helmet pestiin kolmasti lisäämällä 3 ml:n erät deionisoitua vettä, ravistamalla ja sitten imemällä vesi pois. Kuhunkin pestyyn helmeen lisättiin 250 μl kromogeenistä reagenssia, joka sisälsi 7,2 mg/ml o-fenyleenidiamiinidihydrokloridia ja 6 mM H_2O_2 :ta 0,1 M kaliumsitraattipuskurissa, pH 5,25, sekä säilytysaineena 15 0,1 ml/litra Kathon CG[®] -liuosta (Rohm Haasin isotiatsooliiniliuos), ja putkia inkuboitiin 10 minuutin ajan huoneen lämpötilassa pimeässä. Reaktiot pysäytettiin sitten lisäämällä 1 ml 1 N rikkihappoa kuhunkin putkeen ja mitattiin 20 näyteliuoksien absorbanssi 492 nm:n aallonpituudella.

Kuviossa 1 on esitetty käytetyille standardeille absorbanssi 492 nm:n aallonpituudella 9-karboksi-11-nor- Δ^9 -tetrahydrokannabinolipitoisuuden funktiona.

Esimerkki 19

25 Kliininen näyteanalyysi

Keksinnön mukaisen THC-entsyymi-immuunimäärityksen herkkyyden ja tarkkuuden määrittämiseksi analysoitiin 60 kliinisen virtsanäytteen sarja käyttäen kyseistä määrittäystä (EIA) sekä Rochen THC-radioimmuunimääritys- (RIA-) järjestelmää, joiden määrittäysten tulokset on esitetty taulukossa 30 1.

TAULUKKO 1

EIA- ja RIA-THC-analyysien vertailu

5	Näyte- nro	THC (ng/ml) määri- tettynä:		Näyte- nro	THC (ng/ml määri- tettynä:	
		EIA ^a	RIA ^b		EIA ^a	RIA ^b
	1	300	>200	31	>500	>200
	2	>500	>200	32	>500	>200
	3	>500	>200	33	>500	>200
	4	217	>200	34	300	>200
	5	3,5	0,0	35	>500	>200
10	6	>500	>200	36	>500	>200
	7	>500	>200	37	7,0	0,0
	8	>500	>200	38	>500	>200
	9	>500	>200	39	190	200
	10	120	125	40	250	>200
	11	5,0	0,0	41	10,0	0,0
	12	94	141	42	467	>200
	13	189	>200	43	194	106
15	14	47	50	44	465	>200
	15	500	>200	45	16,5	0,0
	16	154	>200	46	>500	>200
	17	217	190	47	>500	>200
	18	110	86	48	>500	>200
	19	180	>200	49	338	176
	20	500	>200	50	>500	>200
	21	>500	>200	51	500	>200
20	22	90	157	52	16,5	0,0
	23	427	>200	53	17,0	0,0
	24	13	0,0	54	>500	>200
	25	>500	>200	55	193	195
	26	>500	>200	56	467	198
	27	>500	>200	57	340	158
	28	466	>200	58	>500	>200
25	29	335	>200	59	>500	>200
	30	8,0	0,0	60	13,5	0,0

^aEIA on keksinnön mukainen THC-entsyymi-immuunimääritys.

^bRIA on Roche Diagnostic Systemsin kaupallisesti saatavana oleva THC-radioimmuunimääritysjärjestelmä mainitun valmistajan ollessa Hoffmann-La Roche Inc., Nutley, New Jersey, yhtiön yksi osasto.

Taulukossa 1 positiivisen testin kynnyksarvoksi oletettiin 50 ng/ml 9-karboksi-11-nor- Δ^9 -tetrahydrokannabinolia EIA-määrityksissä ja 100 ng/ml RIA-määrityksissä. Käyttäen tätä positiivisen tuloksen kriteeriä vain näytteen

18 kohdalla ilmeni ristiriita kyseisellä kahdella analyysimenetelmällä saatujen tulosten välillä. Tämä näyte oli EIA:n mukaan positiivinen mutta RIA:n mukaan negatiivinen. Näyte 18 määritettiin uudelleen kummallakin menetelmällä ja
5 todettiin uusitussa kokeessa positiiviseksi sekä RIA:n että EIA:n mukaan.

THC-entsyymi-immuunimäärityksen spesifisyyden lisävarmennukseksi lisättiin joukko, ei kannabinoideille sukua olevia lääkaineita yhdistettyihin normaaleihin ihmisen virtsanäytteisiin pitoisuutena 10 000 ng/ml ja analysoitiin
10 näytteet kyseistä menetelmää käyttäen. Mikään näistä yhdisteistä, jotka on lueteltu taulukossa 2, ei ollut määrityksessä positiivinen.

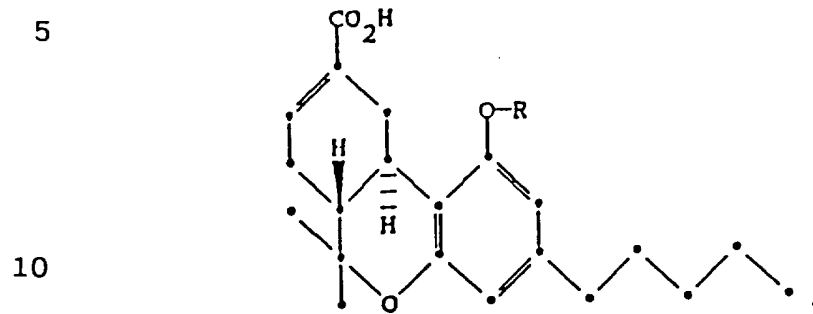
TAULUKKO 2

Poikkireaktiivisuuden suhteen testatut lääkeaineet

	asetaminofeeni	guajakoliglyserolieetteri
5	asetyyლისალისუილიჰაპო	hydroklooritiatsidi
	aminopyriini	hydrokodonibitartraatti
	amitriptyliini	hydromorfonihydrokloridi
	amobarbitaali	p-hydroksifenobarbitaali- monohydraatti
	amfetamiini	imipramiini
10	ampisilliini	lidokaiini
	apomorfiini	melaniini
	askorbiinihappo	meperidiini
	atropiini	metadoni
	bentsokaiini	d-metamfetamiinihydrokloridi
	bentsoyyliekgoniini (kokaiini- metaboliitti)	metakvaloni
15	butabarbitaali	metypryloni
	kafeiini	morfiini
	kalsiumhypokloriitti	naprokseeni
	klooridiatsepoksidi	niasiiniamidi
	kloorifeniramiini	noretindroni
	klorokiini	oksatsepami
20	klooripromatsiini	oksikodonihydrokloridi
	kokaiinihydrokloridi	penisilliini G
	kodeiini	pentobarbitaali
	syklopentobarbitaali	fenyklidiini
	dekstrometorfaani	fenobarbitaali
	dekstropopoksifeeni-HCl	fenotiatsiini
25	diallylibarbituurihappo	fenyylibutatsoni
	diatsepami	fenyylipropanoliamiini
	dihydrokodeiinibitartraatti	prokaiinihydrokloridi
	5,6-dihydroksi-indoli	prometatsiini
	difenylylihydantoiini	propoksifeeni
	ekgoniinihydrokloridi	kiniinihydrokloridi
	epinefriini	natriumsekobarbitaali
30	erytromysiini	tetrasykliini
	estrioli	tetrahydrotsoliini
	gentisiinihappo	trifluoperatsiini
	glutetimidi	somepirakki

Patenttivaatimukset

1. Kannabinolijohdannainen, jolla on kaava



jossa R on liitosketju, joka on p-aminobentsyyli-ryhmä tai
1 - 7 hiiliatomia sisältävä haarautunut tai suoraketjuinen
aminoalkyyli-ryhmä tai tämän happoadditiosuola orgaanisen
15 hapon tai mineraalihapon kanssa, ja joka yhdiste on mahdol-
lisesti kovalenttisesti sidottu leimamolekyyliin havaitse-
misen helpottamiseksi.

2. (trans-rac)-1-(3-aminopropoksi)-6a,7,10,10a-tet-
20 rahydro-6,6-dimetyyli-3-pentyyli-6H-dibentso(b,d)pyraani-9-
karboksyyli-happo tai sen happoadditiosuola orgaanisen hapon
tai mineraalihapon kanssa, joka yhdiste on mahdollisesti
kovalenttisesti sidottu leimamolekyyliin havaitsemisen hel-
pottamiseksi.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukaisen yhdisteen, joka on
25 kovalenttisesti sidottu leimamolekyyliin, käyttö kannabino-
limetaboliittien immuunimäärityksessä.

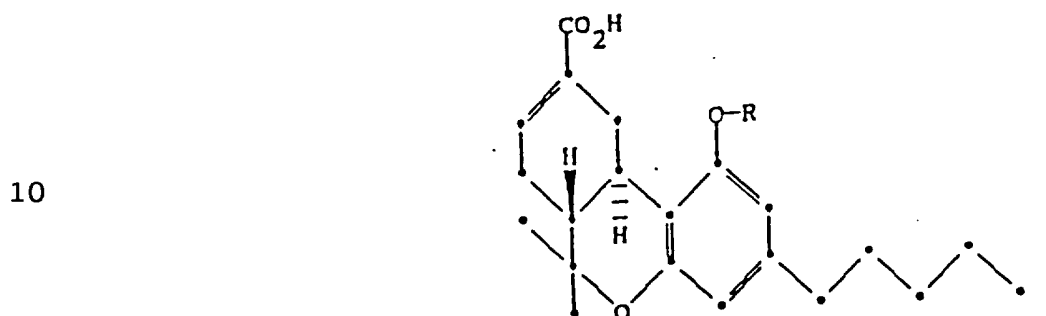
4. Patenttivaatimuksen 2 mukaisen yhdisteen, joka on
kovalenttisesti sidottu leimamolekyyliin, käyttö kannabino-
limetaboliittien immuunimäärityksessä.

30 5. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen yhdiste,
joka on kovalenttisesti sidottu leimamolekyyliin, joka on
entsyyymi.

6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen yhdiste, jossa
entsyyymi on peroksidaasi.

7. Menetelmä kannabinolimetaboliittien immuunimääri-
tyksen suorittamiseksi, t u n n e t t u siitä, että

(a) sekoitetaan näyte, jonka epäillään sisältävän
kannabinolimetaboliitteja, tunnetun määrän kanssa leimattua
5 yhdistettä, joka käsittää yhdisteen, jolla on kaava



jossa R on liitosketju, joka on p-aminobentsyyli-
ryhmä tai
15 1 - 7 hiiliatomia sisältävä haarautunut tai suoraketjuinen
aminoalkyyli-ryhmä tai tämän happoadditiosuola orgaanisen
hapon tai mineraalihapon kanssa, ja joka yhdiste on kova-
lenttisesti sidottu leimamolekyyliin, sekä kannabinolime-
taboliittien vasta-aineita, jotka kykenevät myös selektii-
visesti sitomaan leimatun yhdisteen;
20

(b) erotetaan sidottu leimattu yhdiste vapaasta lei-
matusta yhdisteestä;

(c) mitataan joko vapaan tai sidotun leimatun yhdis-
teen määrä ja

25 (d) verrataan leimatun yhdisteen mitattua määrää
arvoihin, jotka on saatu näytteistä, jotka sisältävät tun-
nettuja määriä kannabinolimetaboliittia.

8. Menetelmä kannabinolimetaboliittien immuunimääri-
tyksen suorittamiseksi, t u n n e t t u siitä, että

30 (a) sekoitetaan näyte, jonka epäillään sisältävän
kannabinolimetaboliitteja, tunnetun määrän kanssa leimattua
yhdistettä, joka käsittää (trans-rac)-1-(3-aminopropoksi)-
6a,7,10,10a-tetrahydro-6,6-dimetyyli-3-pentyyli-6H-diben-
so(b,d)pyraani-9-karboksylihapon tai sen happoadditiosuo-
lan orgaanisen hapon tai mineraalihapon kanssa, sekä kann-
35

binolimetaboliittien vasta-aineita, jotka kykenevät myös selektiivisesti sitomaan leimatun yhdisteen;

(b) erotetaan sidottu leimattu yhdiste vapaasta leimatusta yhdisteestä;

5 (c) mitataan joko vapaan tai sidotun leimatun yhdisteen määrä ja

(d) verrataan leimatun yhdisteen mitattua määrää arvoihin, jotka on saatu näytteistä, jotka sisältävät tunnettuja määriä kannabinolimetaboliittia.

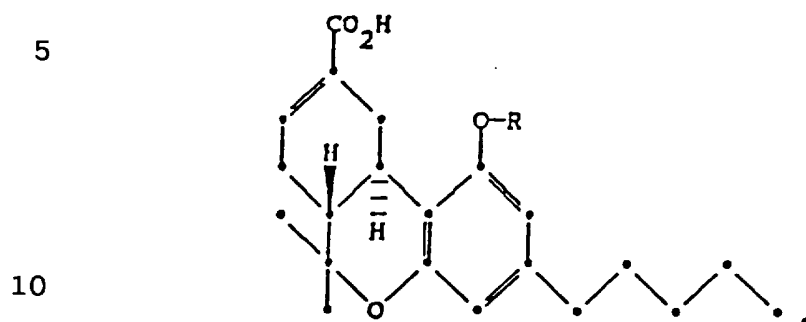
10 9. Patenttivaatimuksen 7 tai 8 mukainen menetelmä, tunnetaan siitä, että vasta-aineet immobilisoidaan kiinteään kantajaan.

10. Patenttivaatimuksen 9 mukainen menetelmä, tunnetaan siitä, että leimamolekyylillä on entsyymi.

15 11. Patenttivaatimuksen 10 mukainen menetelmä, tunnetaan siitä, että entsyymi on peroksidaasi.

Patentkrav

1. Kannabinolderivat med formeln



vari R är en förbindningskedja, som är en p-aminobensyl-
grupp eller en förgrenad eller rakkedjad aminoalkylgrupp
med 1 - 7 kolatomer eller ett syraadditionssalt därav med
15 en organisk syra eller mineralsyra, och vilken förening
eventuellt är kovalent kopplad till en märkt molekyl för
att underlätta detektering.

2. (trans-rac)-1-(3-aminopropoxi)-6a,7,10,10a-tet-
rahydro-6,6-dimetyl-3-pentyl-6H-dibenso(b,d)pyran-9-karbo-
20 xylsyra eller ett syraadditionssalt därav med en organisk
syra eller mineralsyra, vilken förening är eventuellt kova-
ent kopplad till en märkt molekyl för att underlätta detek-
tering.

3. Användning av en förening enligt patentkrav 1,
25 vilken är kovalent kopplad till en märkt molekyl, i immu-
bestämningar av kannabinolmetaboliter.

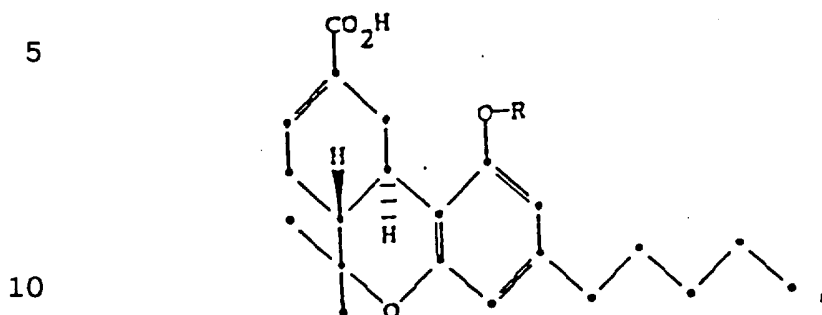
4. Användning av en förening enligt patentkrav 2,
vilken är kovalent kopplad till en märkt molekyl i immu-
bestämningar av kannabinolmetaboliter.

30 5. Förening enligt patentkrav 1 eller 2, vilken är
kovalent kopplad till en märkt molekyl, som är ett enzym.

6. Förening enligt patentkrav 5, i vilken enzymt är
ett peroxidase.

7. Förfarande för immunbestämning av kannabinolme-
35 taboliter, k ä n n e t e c k n a t därav, att man

(a) blandar ett prov vilket misstänks innehålla kannabinolmetaboliter, med en känd mängd av en märkt förening, vilken omfattar en förening med formeln



vari R är en förbindningskedja som är en p-aminobensylgrupp eller en förgrenad eller rakkedjad aminoalkylgrupp med 1 - 7 kolatomer eller ett syraadditionssalt därav med en organisk syra eller mineralsyra, och vilken förening eventuellt är kovalent kopplad till en märkt molekyl, samt antikroppar mot kannabinolmetaboliter, vilka antikroppar dessutom är kapabla att selektivt binda nämnda märkta förening;

(b) separerar den bundna märkta föreningen från den fria märkta föreningen;

(c) mäter mängden av antingen den fria eller den bundna föreningen och

(d) jämför den uppmätta mängden av den märkta föreningen med värden som erhållits från prov, vilka innehåller kända mängder kannabinolmetabolit.

8. Förfarande för immunbestämning av kannabinolmetaboliter, k ä n n e t e c k n a t därav, att man

(a) blandar ett prov vilket misstänks innehålla kannabinolmetaboliter, med en känd mängd av en märkt förening, vilken omfattar (trans-rac)-1-(3-aminopropoxi)-6a,7,10,10a-tetrahydro-6,6-dimetyl-3-pentyl-6H-dibenso-(b,d)pyran-9-karboxylsyra eller ett syraadditionssalt därav med en organisk syra eller mineralsyra, och antikroppar mot kannabinolmetaboliter, vilka antikroppar dessutom är kapabla att selektivt binda nämnda märkta förening;

(b) separerar den bundna märkta föreningen från den fria märkta föreningen;

(c) mäter mängden av antingen den fria eller den bundna föreningen och

5 (d) jämför den uppmätta mängden av den märkta föreningen med värden som erhållits från prov, vilka innehåller kända mängder kannabinolmetabolit.

10 9. Förfarande enligt patentkrav 7 eller 8, k ä n n e t e c k n a t därav, att antikropparna immobiliseras i en fast bärare.

10. Förfarande enligt patentkrav 9, k ä n n e t e c k n a t därav, att den märkta molekylen är ett enzym.

15 11. Förfarande enligt patentkrav 9, k ä n n e t e c k n a t därav, att enzymet är ett peroxidase.



96685

Kuvio 1

