

H669/90

58738

ELJÁRÁS FLUORESzcens FESTÉKEK ELŐÁLLÍTÁSÁRA, ÉS AZOK ALKALMAZÁSÁRA NUKLEINSAVAK FESTÉSÉRE

BECTON, DICKINSON AND COMPANY, Franklin Lakes, New Jersey
Amerikai Egyesült Államok

Bejelentés napja: 1990. 07. 27.

Elsőbbsége: 1989. 07. 28. (07/386 904)

Amerikai Egyesült Államok

K I V O N A T

**KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY**

Az (I) általános képletű új vegyületek - a képletben
R jelentése egymástól függetlenül $-CH_3$ vagy $-CH_2COO^-$
-csoport,
X jelentése anion, és
n értéke egész szám -
elsősorban nukleinsavakhoz kötődnek.

Fenti tulajdonságuk következtében biológiai mintákban
- például vérben vagy annak komponenseiben - nukleinsavak jelenlétének kimutatására használhatók.

X

I. ✓

h660/90

36990

D

Képviselő:

DANUBIA SZABADALMI ÉS VÉDJEGY IRODA KFT

~~Budapest~~

MSZOS: C07D487/04

**KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY**

58738

ELJÁRÁS FLUORESZCENS FESTÉKEK ELŐÁLLÍTÁSÁRA, ÉS AZOK ALKALMA-
ZÁSÁRA NUKLEINSAVAK FESTÉSÉRE

BECTON, DICKINSON AND COMPANY,

Franklin Lakes, New Jersey
Amerikai Egyesült Államok

Feltalálók:

LEE Linda G.,

Mountain View, California,

MIZE Patrick D.,

Durham, North Carolina,

Amerikai Egyesült Államok

Bejelentés napja: 1990. 07. 27.

Elsőbbsége: 1989. 07. 28. (07/386 904)

Amerikai Egyesült Államok

-69799-2847-SI

A találmány tárgya eljárás új fluoreszcens festékek előállítására, amelyek elsősorban nukleinsavakat festenek meg, továbbá eljárás nukleinsavak festésére.

Szerte a világon igen súlyos egészségügyi problémát jelentenek a vérben élő paraziták által okozott fertőzések. A fenti területeken sok helyen nincs sem berendezés, sem szakképzett technikus a biológiai mintákban - például vérben vagy annak komponenseiben - lévő paraziták detektálására alkalmas berendezések kezelésére. A fenti problémák kiküszöbölésére olcsó és kis szakértelmet igénylő berendezéseket fejlesztettek ki, amelyek azonban pontos, könnyen leolvasható eredményeket adnak. A fenti berendezések egyikében egy kapilláris cső van, amely egy olyan fajlagos sűrűségű, általában hengeres tömeget tartalmaz, amely képes a sejt-rétegek egyikében uszni, ha a vérmintát centrifugálással szétválasztják. A tömeget úgy választják meg, hogy az egy vékony gyűrűalakú teret alakít ki a csőben, amelyben a parazitát hordozó sejtek összegyűlnek, így a paraziták koncentrációja egy szűk területen megnövekedik. A csövet ezután mikroszkóp segítségével megvizsgálják, és eldöntik, hogy van-e parazita a gyűrűalakú régióban. A fenti módszert alkalmazó berendezés a 4 190 328 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásból ismert. A fenti módszerrel működő berendezés mint QBC^R-rendszer (Becton Dickinson Primary Care Diagnostics) van kereskedelmi forgalomban.

A fenti módszer hátránya azonban az, hogy a paraziták jelenlétének láthatóbbá tételére nem alkalmaznak festéket, így a paraziták detektálása nehézkes lehet. A paraziták több,

különböző fejlődési szakaszon mennek keresztül egy adott gazdaszervezetben. Az egyes szakaszok megkülönböztetése gyakran nehéz, és bizonyos foku szaktudást és gyakorlatot igényel. Az egyes szakaszok jelenléte vagy hiánya viszont a fertőzés viszonylagos súlyosságára vagy a fertőzés szakaszára jellemző lehet. A 4 190 328 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás szerint membránon átjutó festékként akridin-narancsot használnak, amely a paraziták nukleinsavait megfesti. Az akridin-narancs azonban a vérben lévő egyéb sejtekbe is bejut, és bizonyos mértékben megfesti a sejtmaggal rendelkező fehérvérsejteket is. Ezért ha a klinikusnak nincs gyakorlata a fertőzés szakaszainak felismerésében, hamis pozitív eredményeket kaphat az akridin-narancs, vagy hasonló festékek alkalmazásával.

A vérben élő paraziták analízisére szolgáló másik módszer nem alkalmas a mindennapi használatra, csak kutatási célokra használható. E szerint a módszer szerint egy folyadék-citométert és egy membránon átjutó nukleinsav-festéket, például tiazol-narancsot használnak. A módszert Makler és munkatársai ismertették [Cytometry, 8, 568 (1987)].

Nagy vonalakban, a módszer lényege, hogy a betegből vért vesznek, és a teljes vérben lévő sejteket tiazol-narancssal megfestik. A megfestett sejteket ezután folyadék-citométeren - például FACScan^R-en (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) folytatják keresztül. A sejtek a folyadék-citométeren keresztülhaladva egy érzékelő régión haladnak át, lényegében egyenként, és minden egyes sejtet megvizsgálnak egy gerjesztett hullámhosszu fényben, rendszerint argon-lézerből kibocsátott 488 nm-es fényben. Detektálják a szórt fényt és az egyes sejtek-

ből emittált fluoreszcens fényt megfelelő érzékelők segítségével, például fotodetektorokkal, és minden egyes sejtet azonosítanak az összes detektált fényjel alapján.

Amint azt a fent idézett irodalmi helyen megjegyzik, a sejtmaggal rendelkező sejtek (éretlen vörösvértestek és különféle stádiumu fehérvérsejtek) háttér-festése a vérlemezkéket is megfesti. Noha a fehérvérsejtek festődését a sejt-analízisből ki lehet küszöbölni, a sejtmaggal rendelkező vörösvértesteket és vérlemezkéket nem, így ezek háttér-fluoreszcenciát adnak, ami a parazitát hordozó sejtek felismerését befolyásolhatja.

A fentiek szerint az ismert eljárások továbbfejlesztésére olyan festékre van szükség, amely elsősorban a vérben élő paraziták nukleinsavjait festi meg, és csak kis mértékben, vagy egyáltalán nem festi meg a sejtmaggal rendelkező vörösvértesteket, a fehérvérsejteket és a vérlemezkéket.

A találmány szerinti eljárás az (I) általános képletű nukleinsav-festékek - a képletben

R jelentése $-\text{CH}_3$ vagy $-\text{CH}_2-\text{COO}^-$ és

X^- jelentése anion, például halogenid, szervetlen ion, például PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , IO_4^- , ClO_4^- , NO_3^- , NO_2^- és hasonló ionok, vagy szerves ion, például acetát, glükóz-6-foszfát, D-glukuronát, stb.

R jelentésének nem kell minden helyzetben azonosnak lennie.

A festék 488 nm-en gerjeszthető (maximális gerjesztés 460 nm-en) és nukleinsavak jelenlétében fluoreszcens fényt emittál, 470 - 550 nm-en, a maximális emisszió 478 nm-en van. A

festék szelektíven festi az RNS-t és a DNS-t.

Az ábrák rövid ismertetése:

az 1. ábrán látható a PUR-1-jodid-só-oldat abszorpciója a hullámhossz függvényében, RNS jelenlétében, vagy anélkül;

a 2. ábrán látható a PUR-1-p-toluolszulfonsav-só-oldat fluoreszcenciája a hullámhossz függvényében, RNS jelenlétében, vagy anélkül.

A találmány szerinti eljárással előállított új fluoreszcens festékek elsősorban nukleinsavakat fetenek meg. A festékek 488 nm-en gerjeszthetők és maximális emissziójuk 478 nm-en van. RNS jelenlétében a festék fluoreszcenciája több, mint 7000-szeresére növekedik. A festék kvantum-hozama mintegy 0,4.

A festéket az 1. reakcióvázlat szerinti eljárással állítjuk elő. Az összes kiindulási anyag - hacsak azt másként nem említjük - az Aldrich Chemical Co. terméke. A (2) és (3) köztitermékeket Neiman és munkatársai kissé módosított eljárása szerint állítjuk elő [Israel J. Chem. 3, 161 (1965)]. A (4) köztiterméket Brooker és munkatársai eljárása szerint állítjuk elő [J. Am. Chem. Soc. 67, 1889 (1945)].

Az olvadáspontokat Thomas Hoover kapilláris olvadáspontmérő készülékkel határozzuk meg, és nem korrigáljuk. Az NMR-spektrumot tetrametil-szilán belső standarddal határozzuk meg. Az analitikai, fordított fázisu nagynyomású folyadékkromatográfiás eljárást (HPLC) Waters 860 két szivattyús rendszerben végezzük, fotodióda-sor detektálással (200 - 600 nm), 4,6 x 220 mm-es Brownlee ciano-oszlopot használva, az alábbi körülmények között: először 5 percen keresztül 50 mmól/l koncentráció-

-éterrel mossuk. Mosás után a reakcióelegy fehér, amorf szilárd anyag formáját ölti. A szerves mosófolyadékokat egyesítjük, fehér, kristályos szilárd anyag keletkezik. Ezt az anyagot [(3) vegyület] egyesítjük az amorf szilárd anyaggal, és további tisztítás nélkül használjuk a PUR-1 előállítására.

2,3-Dimetil-benzotiazólium-jodid [(4) vegyület] előállítása

Fém keverővel és visszafolyató hűtővel felszerelt gömblimbikba 4,8 g metil-jodidot és 5 g 2-metil-benzotiazolt mérünk. A lombikot olajfürdőn 80 °C-on 16 órán keresztül melegítjük. A kapott rózsaszínes-fehér szilárd anyagot [(4) vegyület] lehütjük, összetörjük, acetonnal mossuk és szűrjük.

3-Metil-2-[(3,7-dimetil-6-purinilidén)-metil]-benzotiazólium-jodid [(5) vegyület] előállítása

Mágneses keverővel és visszafolyató hűtővel felszerelt gömblimbikba 1,28 g 2,3-dimetil-benzotiazólium-jodidot [(4) vegyület], kb. 1,50 g (4,4 mmól) nyers 3,7-dimetil-6-(metil-tio)-purinium-p-toluolszulfonátot [(3) vegyület], 20 ml metanolt és 0,5 ml trietil-amint mérünk. Az elegyet kb. 45 percen keresztül visszafolyató hűtő alatt forraljuk, így sárga, szilárd anyagot tartalmazó vörös oldatot kapunk. Az anyagot lehütjük, szűrjük és metanollal és dietil-éterrel mossuk. Sárga-narancssárga szilárd anyagot kapunk, amelyet mint cím szerinti vegyületet azonosítunk.

A PUR-1 a találmány szerinti eljárással előállított festékek előnyös képviselője, amelynek jellemzői:
Olvadáspont: 340 - 345 °C;

NMR-spektrum (CD_3OD) δ :

3,97 (s, 3H), 3,99 (s, 3H), 4,27 (s, 3H), 6,56 (s, 1H), 7,39 (t, 1H), 7,57 (d, 1H), 7,80 (d, 1H), 8,04 (d, 1H), 8,54 (s, 1H), 8,85 (s, 1H);

HPLC: egy komponens retenciós ideje 30 perc;

UV-spektrum: $\lambda_{\text{max}} = 448 \text{ nm}$;

Nagyfeloldású FAB-MS a $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{SI}^+$ összegképlet alapján:

számitott: 310,1126

talált: 310,1136.

A p-toluolszulfonát-sót úgy állítjuk elő, hogy a 2,3-dimetil-benzotiazólium-jodid helyett 2,3-dimetil-benzotiazólium-p-toluolszulfonátot használunk. A PUR-1 p-toluolszulfonát-sójának jellemzői:

NMR-spektrum (200 MHz, CD_3OD) δ :

8,66 (s, 1H), 8,31 (s, 1H), 7,9 - 7,2 (m, 8H), 6,55 (s, 1H), 4,28 (ss, 3H), 4,03 (s, 3H), 3,98 (s, 3H), 2,30 (s, 3H).

A többi sókat a jodidsóból állíthatjuk elő, anioncserélő eljárással. Röviden, 10 x 250 mm-es Brownlee Aquapore Anion oszlopon 2,0 ml/perc sebességgel átszivattyuzzuk az eluent. Az oszlopot mintegy 100 ml vízzel átmossuk, majd a kicserélendő anion nátriumsójának 10 ml 1,0 mól/l koncentrációjú oldatával ekvilibráljuk. A puffer feleslegét 200 ml vízzel lemossuk az oszlopról. Az oszlopra felvisszük a festék jodidsóját, és vízzel vagy víz és acetonitril 1:1 térfogatarányú elegyével eluáljuk.

A fenti módon előállított PUR-1-sókat az I. táblázatban foglaljuk össze.

I. táblázat

Ekvilibráló só	Eluálószer	Végső sóforma
1,0 mól/l NaHPO_4	viz	(PUR-1)- NaHPO_4
1,0 mól/l NaSO_4	viz	(PUR-1)- NaSO_4
1,0 mól/l Na-oxalát	viz:acetonitril	(PUR-1)-oxalát
1,0 mól/l Na-D- -glukuronát	viz:acetonitril	(PUR-1)-D-glukuronát

Azt tapasztaltuk, hogy a PUR-1 PO_4^{3-} és SO_4^{2-} formája sokkal jobban oldódik, mint a PUR-1 jodid formája. Ezért előnyösebb a PUR-1 fenti formáit alkalmazni a jodid forma helyett kapilláriscsövek bevonására, amelyekbe később a vizsgálandó vért vagy vér-komponenst bevisszük.

A PUR-1 jodidsójának oldhatóságát is fokozhatjuk, ha a nitrogénhez kapcsolódó metilcsoportok valamelyikét vagy mind-egyikét $-\text{CH}_2\text{COO}^-$ csoporttal helyettesítjük. Ezt azáltal érhetjük el, hogy a (3) vegyület előállítására metil-p-toluolszulfonát helyett bróm-ecetsavat használunk.

Az 1. ábrára vonatkozóan, a PUR-1 p-toluolszulfonát-sóját metanolban oldjuk, 1 mmól/l koncentrációban. Az oldatot foszfáttal pufferolt sóoldattal (PBS) 2×10^{-5} mól/l-re, vagy 1 mg/ml RNS-t (torula élesztő, Sigma Chemical Co.) tartalmazó PBS-sel 2×10^{-5} mól/l-re hígítjuk. Az RNS távollétében az ab-

szorpciós maximum 448 nm ($\epsilon = 6,3 \times 10^4 \text{ l.mól}^{-1}\text{cm}^{-1}$), RNS jelenlétében az abszorpciós maximum 459 nm ($\epsilon = 6,0 \times 10^4 \text{ l.mól}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

A 2. ábrával kapcsolatban, a PUR-1-ből PBS-sel 100 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációju oldatot készítünk. 3 ml-es küvettába 2,97 ml PBS-t és 0,03 ml PUR-1-oldatot mérünk. 460 nm gerjesztési hullámhosszon mérjük az oldat fluoreszcenciás emisszióját. RNS távollétében nem észlelünk emissziót. Másik küvettába 2,97 ml PBS-t, 0,30 ml 1 mg/ml koncentrációju RNS-oldatot és 30 μl PUR-1-oldatot mérünk. A fluoreszcenciás emissziót a fentiek szerint mérjük. Széles emissziós görbét kapunk, amelynek maximuma 478 nm-en van, és a kvantum-hozam kb. 0,4.

A találmány oltalmi körébe tartozik minden olyan változtatás vagy módosítás is, amely szakember számára kézenfekvő.

S z a b a d a l m i i g é n y p o n t o k

1. Eljárás az (I) általános képletű vegyületek - a képletben

R jelentése egymástól függetlenül $-CH_3$ vagy $-CH_2COO^-$ csoport,

X jelentése anion és

n értéke egész szám -

előállítására, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy egy (II) általános képletű vegyületet - a képletben

R jelentése a tárgyi körben megadott és

X jelentése halogenidion vagy p-toluolszulfonát ion - egy (III) általános képletű vegyülettel - a képletben

R jelentése a tárgyi körben megadott - reagáltatunk trietil-amin jelenlétében, rövidszénláncu alkoholban, és a kapott (I) általános képletű vegyület anionját kívánt esetben ismert módon más anionra cseréljük.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás olyan (I) általános képletű vegyületek előállítására, amelyek képletében

X^- jelentése halogenidion,

a z z a l j e l l e m e z v e , hogy a megfelelő kiindulási vegyületeket használjuk.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás olyan (I) általános képletű vegyületek előállítására, amelyek képletében

X jelentése PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , IO_4^- , ClO_4^- , NO_3^- vagy NO_2^- ion,

azzal jellemezve, hogy a megfelelő kiindulási vegyületeket használjuk.

4. Az 1. igénypont szerinti eljárás olyan (I) általános képletű vegyületek előállítására, amelyek képletében
X jelentése acetát-, glükóz-6-foszfát- vagy D-glukuro-

azzal jellemezve, hogy a megfelelő kiindulási vegyületeket használjuk.

5. A 2. igénypont szerinti eljárás olyan (I) általános képletű vegyületek előállítására, amelyek képletében
X jelentése I^- és

R jelentése $-CH_3$,

azzal jellemezve, hogy a megfelelő kiindulási vegyületeket használjuk.

6. A 3. igénypont szerinti eljárás olyan (I) általános képletű vegyületek előállítására, amelyek képletében
X jelentése PO_4^{3-} vagy SO_4^{2-} és

R jelentése $-CH_3$,

azzal jellemezve, hogy a megfelelő kiindulási vegyületeket használjuk.

7. Eljárás nukleinsavak festésére biológiai mintában, azzal jellemezve, hogy a mintát egy (I) általános képletű vegyülettel - a képletben

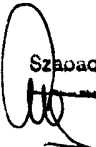
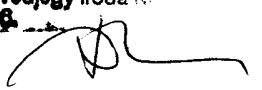
R jelentése egymástól függetlenül $-CH_3$ vagy $-CH_2COO^-$ csoport,

X jelentése anion és
n értéke egész szám -
reagáltatjuk.

8. A 7. igénypont szerinti eljárás, a z z a l
j e l l e m e z v e , hogy a minta vér, vagy annak egy komponense.

9. Az 1. igénypont szerinti eljárás az (5) képletű
vegyület előállítására, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy a megfe-
lelő kiindulási vegyületeket használjuk.

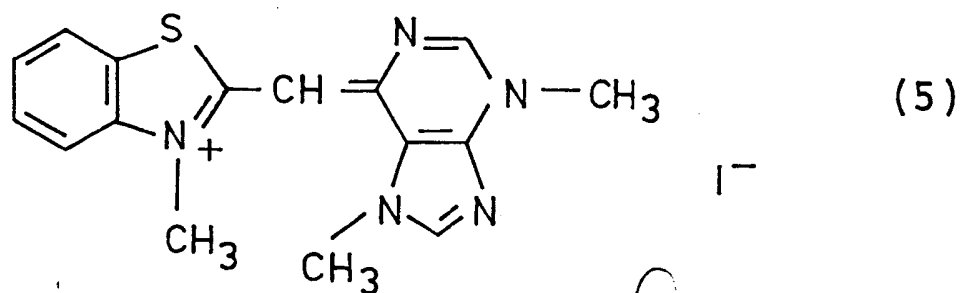
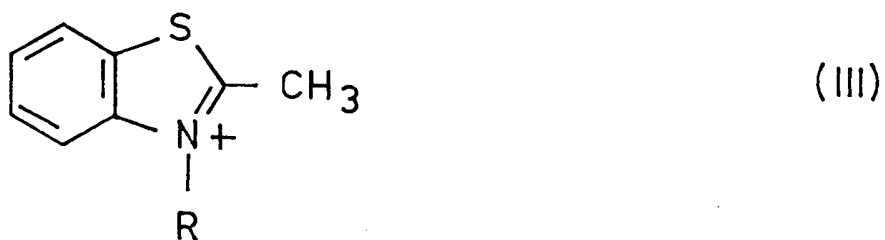
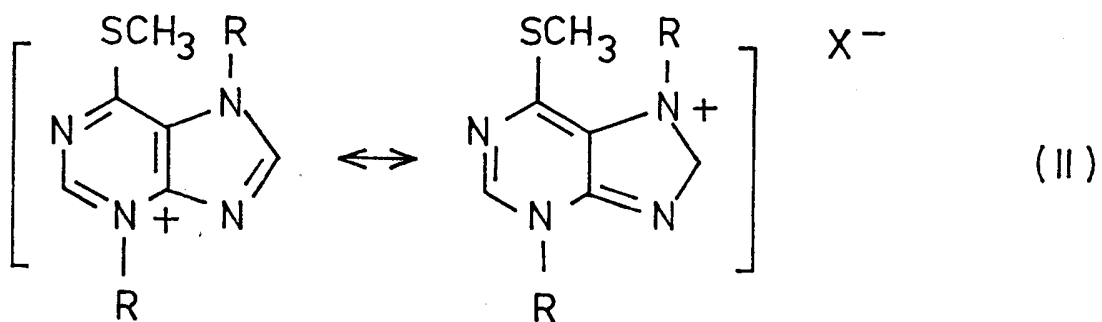
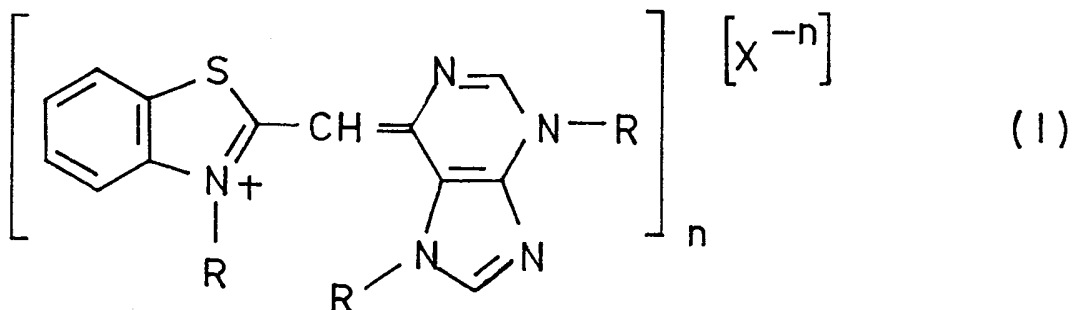
A meghatalmazott:

 **DANUBIA**
Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.


3 lap rajz

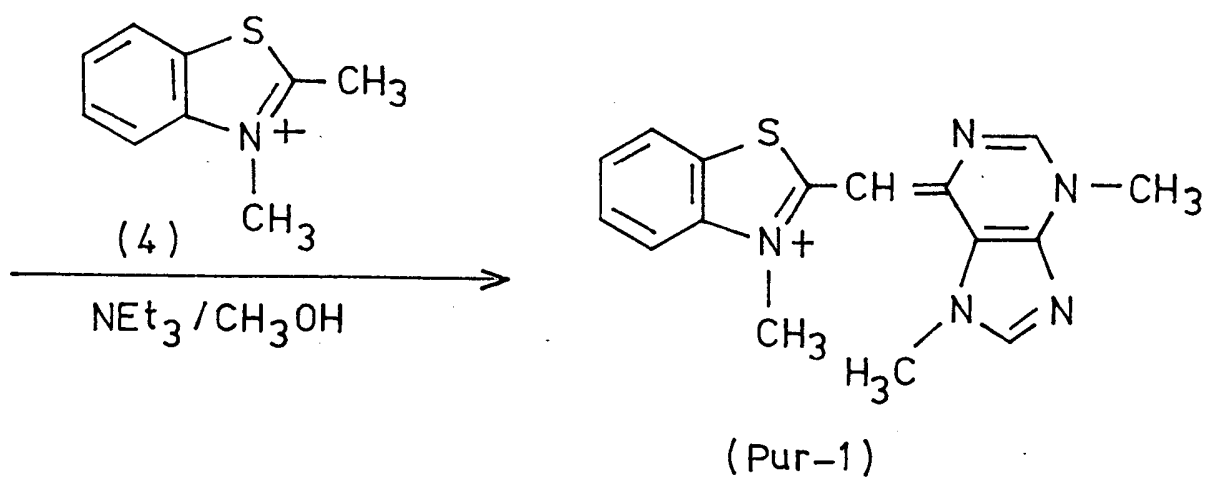
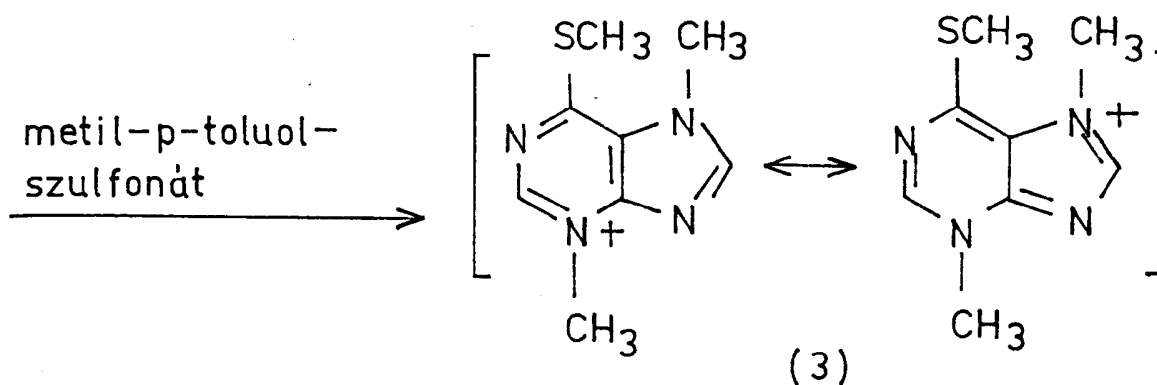
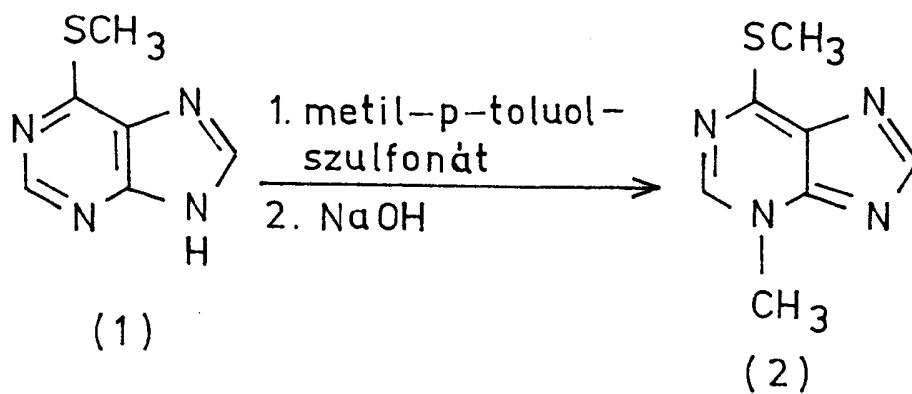
Aktaszámunk: 69799-2847-SI

Ügyintézőnk: dr. Kiss Ildikó

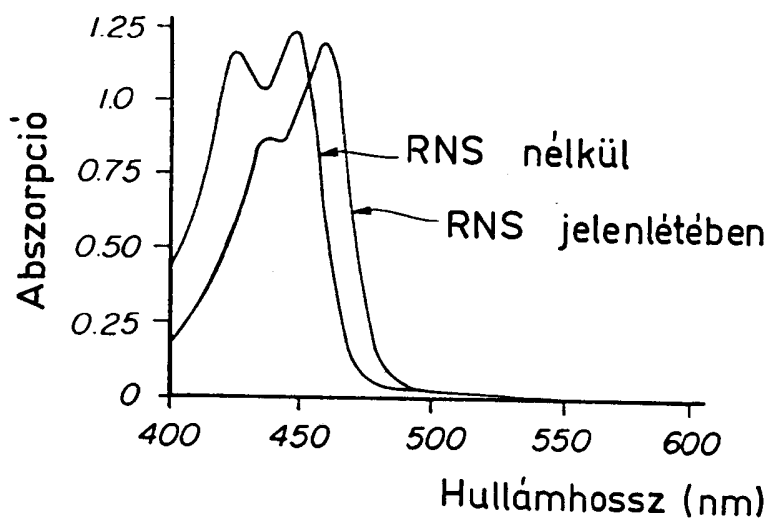


1. reakcióvázlat

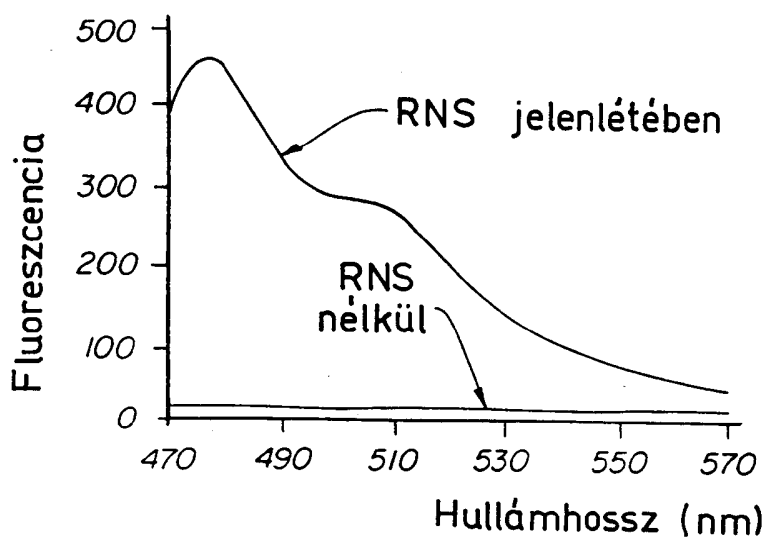
KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY



**KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY**



1. ábra



2. ábra