



Patentdirektoratet
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 2940/82

(51) Int.Cl.5

C 07 D 233/68

(22) Indleveringsdag: 30 jun 1982

C 07 C 59/68

G 01 N 33/534

(41) Alm. tilgængelig: 02 jan 1983

(44) Fremlagt: 16 nov 1992

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 01 jul 1981 FR 8112934

(71) Ansøger: *ROUSSEL-UCLAF S.A.; 35, Boulevard des Invalides; 75007 Paris, FR

(72) Opfinder: Alain *Jouquey; FR, Gaetan *Touyer; FR

(74) Fuldmægtig: Patentbureauet Magnus Jensens Eftf.

(54) Radioaktive stilbenderivater mærket med iod, fremgangsmåde til fremstilling deraf og mellemprodukt

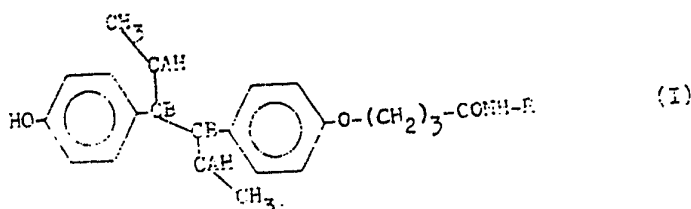
(56) Fremdragne publikationer

Andre publikationer: Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals,
vol. 16, nr. 3, 1979, side 501-506, H.J. Johnson et al.

(57) Sammendrag:

2940-82

Opfindelsen angår radioaktive stilbenderivater mærket med iod og med den almene formel I



hvor A og B betegner hydrogen eller tilsammen danner en dobbeltbinding, og R betegner resten af en aminosyre eller et aminosyrederivat, hvilken rest har en iodmodtagende gruppe og er mærket med iod-125 eller -131.

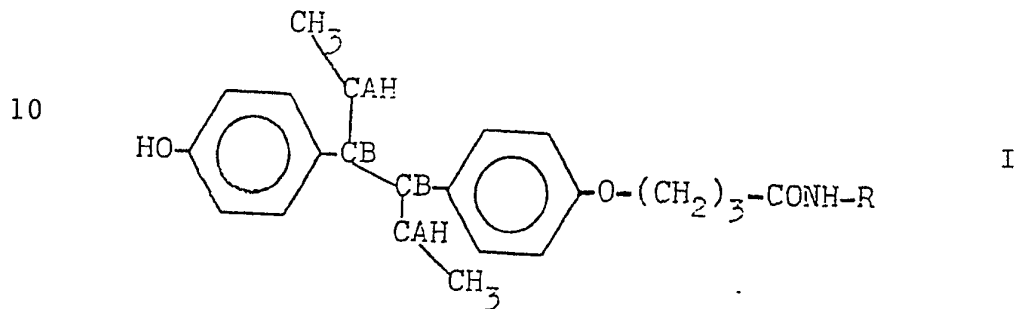
Opfindelsen angår ligeledes fremstillingen af derivaterne I, deres anvendelse til analyse af dienestrol, hexestrol og diethylstilbestrol, hidtil ukendte mellemprodukter og deres anvendelse til fremstilling af antigener, hidtil ukendte antigener og deres anvendelse til fremstilling af antistoffer.

- 1 -

Opfindelsen angår hidtil ukendte iodmærkede radioaktive stilbenderivater, deres fremstilling og mellemprodukter ved deres fremstilling. Forbindelserne ifølge opfindelsen anvendes til radioimmunologiske analyser.

5

Opfindelsen angår radioaktive stilbenderivater mærket med iod-125 eller -131 og med den almene formel I

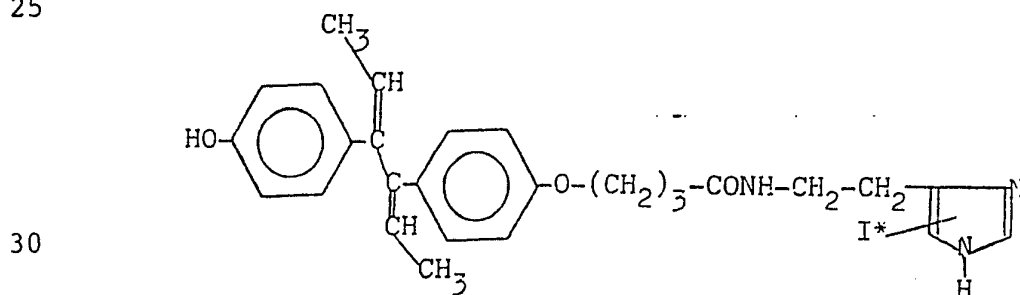


15 hvor A og B hver betegner et hydrogenatom eller tilsammen betegner en dobbeltbinding, og -NHR betegner histaminyl, som er mærket med iod-125 eller -131.

20 Opfindelsen angår således radioaktive stilbenderivater med histamin mærket med iod-125 eller -131. Særligt foretrukne er

- 4-0-monocarboxypropyl-dienestrol koblet til $^{125}_{\text{I}}$ -histamin med formelen

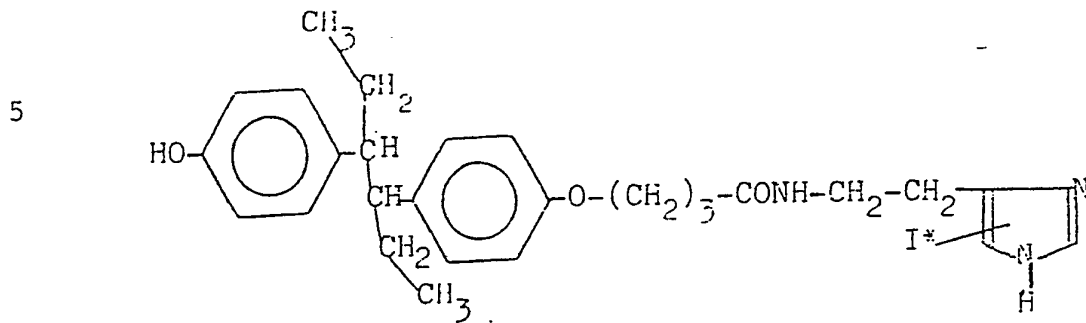
25



hvor tegnet * angiver, at det drejer sig om radioaktivt iod-125, hvilket iod-125 kan være i 2- eller 5-stillingen, og

35

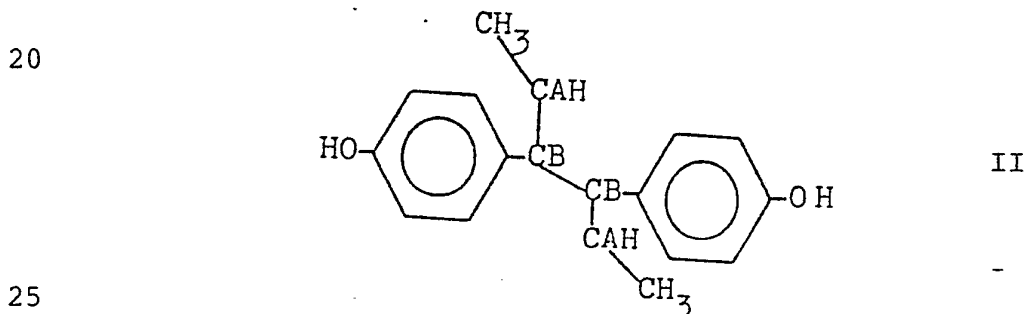
- 4-0-monocarboxypropyl-hexestrol koblet til ^{125}I -histamin med formen



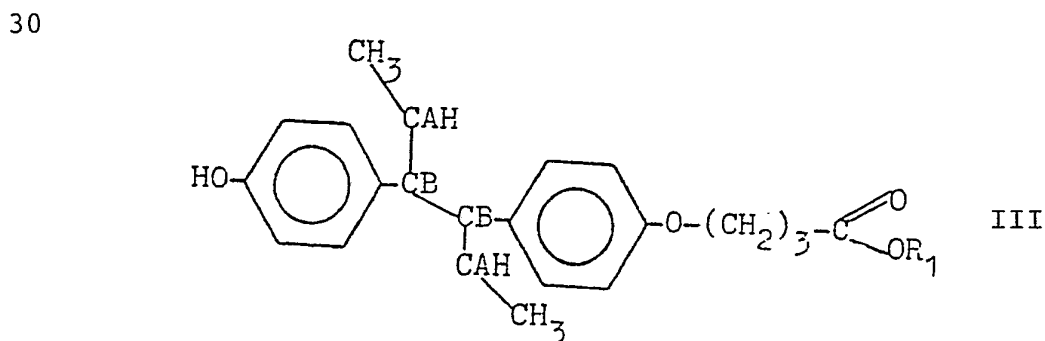
- 10 hvor tegnet * angiver, at det drejer sig om radioaktivt iod-125, hvilket iod-125 kan være i 2- eller 5-stillingen.

Opfindelsen angår ligeledes en fremgangsmåde til fremstilling af forbindelserne med formen I, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved:

- at man omsætter en forbindelse med den almene formel II

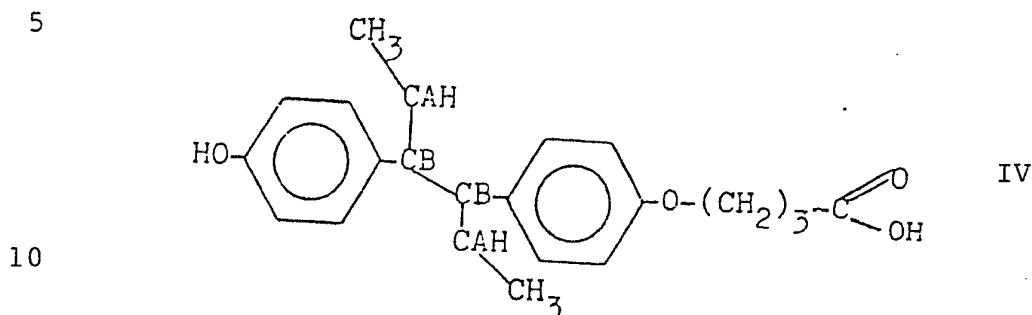


hvor - ligesom i det følgende - A og B har samme betydning som ovenfor, med et alkylhalogenbutyrat i nærværelse af en base til opnåelse af etheren med den almene formel III

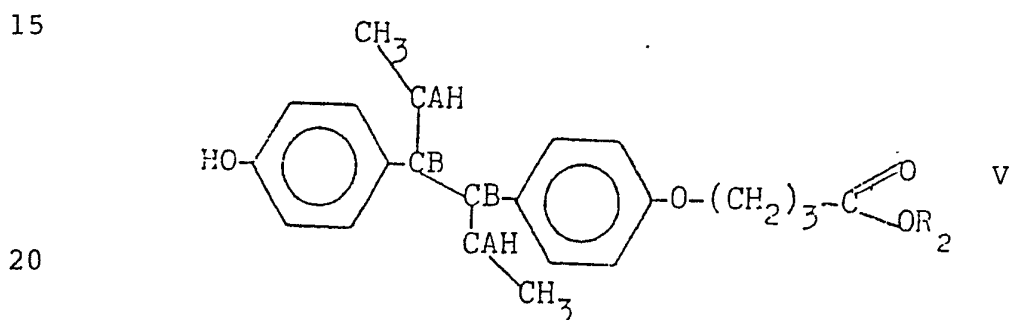


hvor R_1 betegner en alkylgruppe med højst 6 carbonatomer,

- hvori man hydrolyserer estergruppen til opnåelse af en forbindelse med den almene formel IV



- hvorpå man på syregruppen i denne forbindelse med formelen IV fikserer en aktivatorgruppe for carbonylgruppen og får forbindelsen med den almene formel V

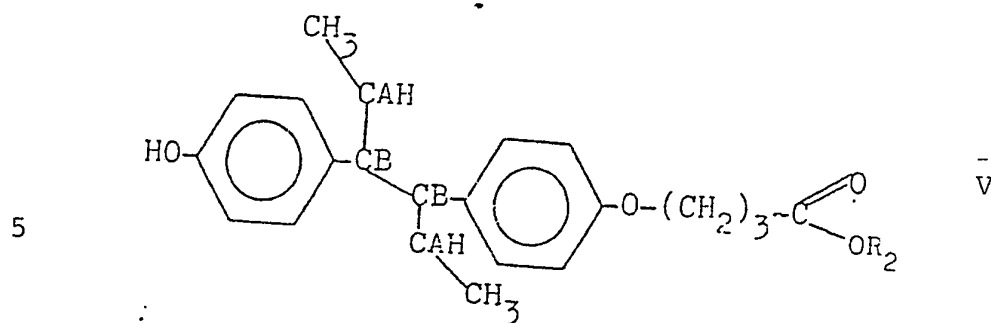


hvor R_2 betegner en aktivatorgruppe med formlen $-\text{COOAlk}$, hvor Alk er en C_1 - C_6 -alkylgruppe,

- som man omsætter med iodoptagende histamin eller med et derivat deraf og får den ønskede forbindelse med den almene formel I.

Denne fremgangsmåde gennemføres fortrinsvis på følgende måde:

- 30
- På syregruppen i forbindelsen med den almene formel IV fikserer man en aktivatorgruppe for carbonylgruppen, idet man omsætter forbindelsen med formlen IV med et alkylhalogenformiat i nærværelse af en tertiær base, i vandfrit miljø og under indifferent atmosfære og får forbindelsen med den almene formel V
- 35



hvor R_2 er en aktivatorgrube med formelen $-\text{CO}-\text{O}-\text{Alk}$, idet Alk er en alkylgrube med højst 6 carbonatomer.

10

Under foretrukne betingelser for iværksættelsen er fremgangsmåden ifølge opfindelsen ejendommelig ved følgende punkter:

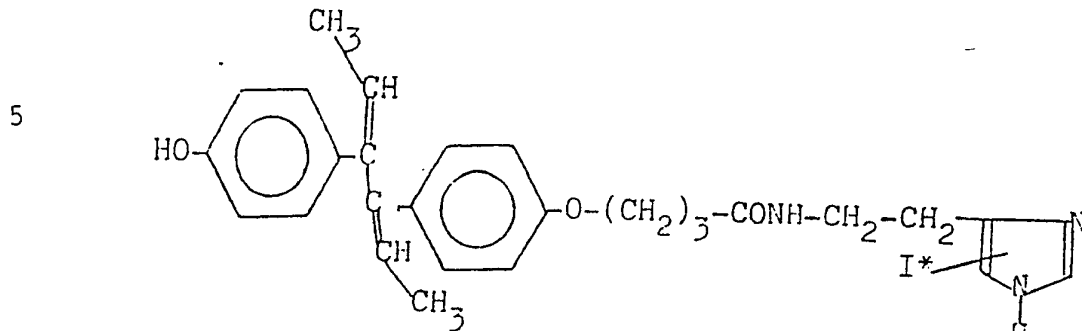
- 15 - Det alkylhalogenbutyrat, som man omsætter med forbindelsen med den almene formel II, er ethylbrombutyrat, og man arbejder i nærværelse af kaliumcarbonat.
- Man hydrolyserer estergruppen i forbindelsen med den almene formel III ved hjælp af methanolisk natriumhydroxid.
- 20
- Den forbindelse, som gør det muligt at fiksere en aktivatorgrube for carbonylgruppen, som man omsætter med forbindelsen med den almene formel IV, er isobutylchlorformiat, og man arbejder i nærværelse af tri-n-butylamin i vandfrit dioxan og under indifferent atmosfære.
- 25

Aktiveringen af carbonylgruppen i forbindelsen med den almene formel IV kan også udføres, idet man på denne forbindelse lader indvirke N-hydroxysuccinimid eller dicyclohexylcarbodiimid, som frembringer aktiveringsgrupper for carbonylgruppen.

30

35 Den beskrevne fremgangsmåde gør det muligt ud fra dienestrol at opnå:

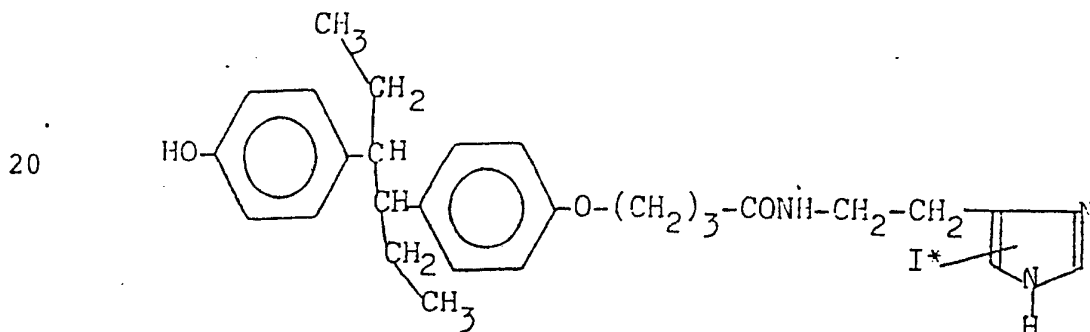
- 4-0-monocarboxypropyl-diendestrol koblet til ^{125}I -histamin og med formlen



- 10 hvor tegnet * angiver, at det drejer sig om radioaktivt iod-125, hvilket iod-125 kan være i 2- eller 5-stillingen,

samt ud fra hexestrol at opnå:

- 15 - 4-0-monocarboxypropyl-hexestrol koblet til ^{125}I -histamin med formlen



- 25 hvor tegnet * angiver, at det drejer sig om radioaktivt iod-125, hvilket iod-125 kan være i 2- eller 5-stillingen.

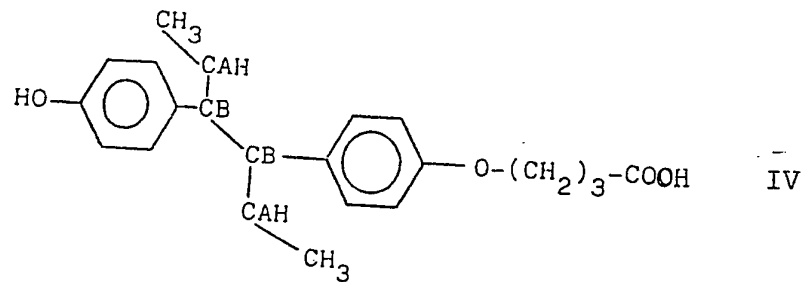
Man anvender forbindelserne med den almene formel I til radioimmunologiske analyser af diendestrol, hexestrol samt diethylstilbestrol i galde, urin, fæces, plasma og væv hos

30 dyr og mennesker samt i fødemidler til dyr og mennesker.

Opfindelsen angår ligeledes - som hidtil ukendte mellemprodukter til fremstilling af forbindelserne med formlen I -

35 forbindelserne med den almene formel IV

- 6 -



5

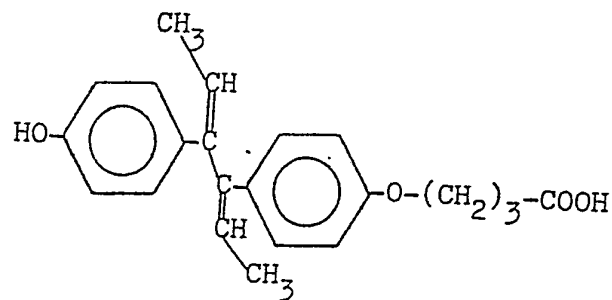
hvor A og B hver betegner hydrogen eller tilsammen betegner en dobbeltbinding.

Blandt disse forbindelser skal nævnes følgende forbindelser:

10

- 4-0-monocarboxypropyl-dienestrol med formlen

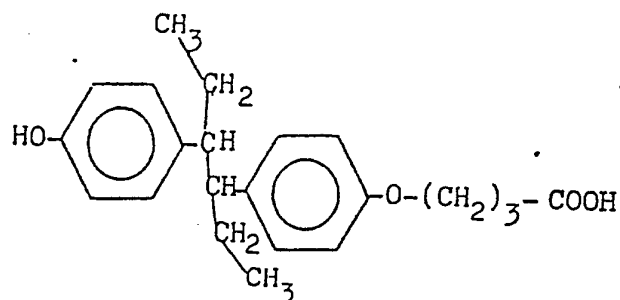
15



20

og 4-0-monocarboxypropyl-hexestrol med formlen

25



30

De omhandlede forbindelser med den almene formel I, navnlig 4-0-monocarboxypropyl-dienestrol-¹²⁵I-histamin og 4-0-monocarboxypropyl-hexestrol-¹²⁵I-histamin er som allerede nævnt nyttige til radioimmunologisk analyse af dienestrol, hexestrol samt diethylstilbestrol.

35

De muliggør analyse af disse stilbener i biologiske væsker og væv og i fødemidler til dyr og mennesker.

5 Den radioimmunologiske analyse udføres ifølge S.A. Bergson og R.S. Yalow, Hormone 4 side 557 (1964) og G.E. Abraham "Journal of Chemical endocrinonal metab" 29 side 866 (1969).

10 Et amid dannet af histamin og 4-0-(carboxypropyl)-diethylstilbestrol, substitueret i histaminresten med iod-125, er beskrevet af H.J. Johnson, S.F. Cernosek og R.M. Gutierrez-Cernosek i Journal of Labelled Compounds Radiopharmaceutic- als bd. XVI, nr. 3, side 501-506.

15 Denne forbindelse tillader udelukkende den radioimmunologi- ske analyse af diethylstilbestrol og med kun ringe følsom- hed. Endelig tillader den ikke analyse af andre stilbener såsom dienestrol eller hexestrol.

20 Derimod tillader forbindelserne med formlen I ifølge opfin- delsen med stor præcision ikke blot analyse af dienestrol og hexestrol, men overraskende ligeledes af diethylstilbe- strol.

25 Det kan fx dreje sig om analyse af spor af disse stilbener i dyrekroppe, væv, legemsvæsker og ekskreter fra køer.

30 Nedenstående eksempler og test illustrerer opfindelsen i forbindelse med tegningen, i hvis eneste figur y-aksen an- giver procenten af maksimal binding af etiketteret forbin- delse til antistof, medens x-aksen angiver mængden af uetiketteret DES (diethylstilbestrol) i pg (pilogram) (se testen nedenfor).

35

Eksempel 14-0-monocarboxypropyl-dienestrol koblet til ¹²⁵I-histaminTrin A: 4-0-monoethoxycarbonylpropyl-dienestrol

5 Man fremstiller en blanding af 20 g dienestrol, 7 g ethyl-
brombutyrat og 4,6 g tørt kaliumcarbonat i 300 ml acetone,
opvarmer denne blanding til tilbagesvaling i ca. 17 timer,
lader den derpå afkøle til stuetemperatur, hælder den i
vand, ekstraherer med ethylacetat, vasker de forenede orga-
nisme faser med vand, tørrer dem, behandler dem med aktiv-
10 kul, afdamper opløsningsmidlet og tørrer under formindsket
tryk. Man får 24,4 g af en halvkrystallinsk rest, som man
renser ved chromatografi på silicagel under tryk under elu-
ering med en blanding af methylenchlorid og methanol (95:5)
og får 6,36 g af den forventede forbindelse. Smp ca. 86°C.

15 I.R. spektrum (chloroform):

OH ca. 3590 cm⁻¹

C=O ca. 1728 cm⁻¹

aromatisk ca. 1610 cm⁻¹

1590 cm⁻¹

20 1573 cm⁻¹

1510 cm⁻¹

Trin B: 4-0-monocarboxypropyl-dienestrol

25 Man indfører i 155 ml methanol 6,16 g af det i forrige trin
opnåede stof og 31 ml 2 N natriumhydroxid, opvarmer den
fremkomne opløsning til tilbagesvaling i 1 time, og efter
afkøling til stuetemperatur indstiller man pH-værdien på
5-6 ved tilsætning af 7 ml eddikesyre. Derpå hælder man
reaktionsblandingen i vand, ekstraherer med ethylacetat,
30 forener de organiske faser, vasker dem med vand, tørrer
dem, behandler med aktivkul, afdamper opløsningsmidlet,
inddamper til tørhed under formindsket tryk og får 5,48 g
råprodukt. Dette renses ved passage over natriumsaltet og
tilbagevenden til den frie syre, og man får 5,16 g af den
35 ønskede forbindelse. Smp. 158°C.

Analyse: $C_{22}H_{24}O_4$
 beregnet: C% 74,98 H% 6,86
 fundet: 74,7 7,0

5 Trin C: Blandet anhydrid af isobutylformiat og
4-0-monocarboxypropyl-dienestrol

Man blander i rækkefølge 2,5 mg af den i forrige trin fremstillede forbindelse, 50 µl dioxan, 10 µl blanding af dioxan og tri-n-butylamin (5:1) og 10 µl blanding af dioxan og isobutylchlorformiat (10:1). Opløsningen omrøres i 30 minutter under indifferent atmosfære, og derpå tilsætter man 3,4 ml dioxan. Der fås en opløsning af den ønskede forbindelse, som man umiddelbart benytter til det næste trin af syntesen.

15

Trin D: 4-0-monocarboxypropyl-dienestrol koblet
til 125 I-histamin

Iodering af histamin:

Man fremstiller 10 µl af en opløsning af histamin 10^{-4} M i en 0,5 M natriumphosphatstødpudeopløsning med pH-8, og derpå tilsætter man i rækkefølge 1 mCi 125 I-natriumiodid (specifik aktivitet 2000 Ci/mmol) i 5 ul destilleret vand og 50 µg chloramin T i 10 µl destilleret vand. Man omrører reaktionsblandingen i 75 sekunder, tilsætter en opløsning af 300 µg natriummetabisulfit opløst i 10 µl destilleret vand og får en vandig opløsning af den ønskede forbindelse, $R_f = 0,1$ (chromatografi på silicagel, opløsningsmiddelsystem: methanol og triethylamin (98:2)).

30

Kondensation:

Til denne opløsning sætter man 50 µl af opløsningen af blandet anhydrid fra forrige trin, omrører og lader henstå i mørke i 2 timer ved en temperatur nær $4^{\circ}C$. Man fortynder derpå reaktionsblandingen med 0,3 ml af en 10^{-1} M vandig natriumbicarbonatopløsning, ekstraherer med 1,5 ml methylenchlorid, afdamper den organiske fase under indifferent atmosfære, optager resten i 100 µl methylenchlorid, chroma-

35

tograferer på silicagel under eluering med en blanding af chloroform og methanol (97:3) og forener de fraktioner, som indeholder produktet. Det opnåede produkt har en total aktivitet på 100 μ Ci.

5

Eksempel 24-0-monocarboxypropyl-hexestrol koblet til 125 I-histamin

Idet man går frem som beskrevet i eksempel 1 ud fra hexestrol, får man:

10 - 6,7 g 4-0-monoethoxycarbonylpropyl-hexestrol
smp. ca. 110°C

I.R. spektrum (chloroform):

OH ca. 3590 cm^{-1}

C=O ca. 1725 cm^{-1}

15 aromatisk 1610 cm^{-1}

1594 cm^{-1}

1580 cm^{-1}

1508 cm^{-1}

20 - 4,5 g 4-0-monocarboxypropyl-hexestrol
smp. ca. 183°C

Analyse: $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{O}_4$

beregnet: C% 74,13 H% 7,92

fundet: 74,4 8,1

25 - blandet anhydrid af 4-0-monocarboxypropyl-hexestrol og
isobutylformiat

- 4-0-monocarboxypropyl-hexestrol koblet med 125 I-histamin
med en total aktivitet på 100 uCi.

30

35

- 11 -

T e s t

Der udføres følgende test til fastlæggelse af standardkurver til bestemmelse af diethylstilbestrol (DES) under anvendelse af iodetiketteret hexestrol (HEX*) eller iodetiketteret dienestrol (DIEN*) som beskrevet i eksempel 1 og 2.

Til fastlæggelse af standardkurverne for DES ved radioimmunoanalyse (RIA) benyttes iodetiketteret HEX* eller DIEN* og anti-DES-antiserum.

Til de forskellige standardopløsninger af det uetiketterede DES sættes konstante mængder af ioderet HEX* eller ioderet DIEN* og en konstant mængde anti-DES-antiserum.

Efter inkubering natten over og adskillelse af den bundne fraktion fra den frie fraktion måles den til antistoffet bundne radioaktivitet for hver af de undersøgte opløsninger i en gammatæller.

Hver måling udføres tre gange, og de viste resultater er middelværdierne for de tre bestemmelser.

Hvert af disse resultater udtrykkes som en procentsats af maksimal binding. (Den maksimale binding opnås, når den uetiketterede forbindelse udelades.)

Denne maksimale binding afsættes på y-aksen i semilogaritmiske koordinater. Mængderne af uetiketteret DES angives på x-aksen.

De opnåede standardkurver fremgår af fig. I.

Konklusion: Under anvendelse af DES-antistof og enten iodetiketteret HEX* eller iodetiketteret DIEN* kan der fastlægges standardkurver.

De således bestemte følsomhedsgrænser (5 pg DES : ^{125}I -HEX* og 25 pg DES : ^{125}I -DIEN*) er tilstrækkelige til at tillade bestemmelsen af DES i biologiske væsker og væv.

5

10

15

20

25

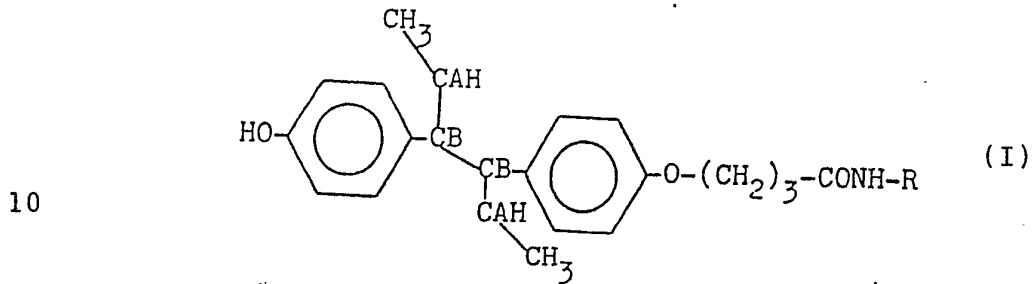
30

35

P a t e n t k r a v

1. Radioaktive silbenderivater mærket med iod-125 eller -131 og med den almene formel I

5



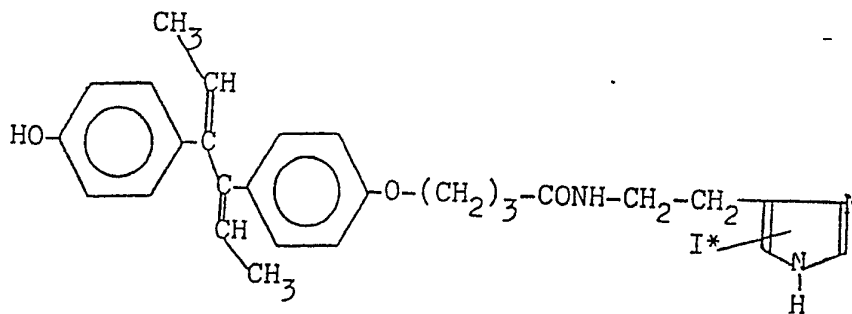
15 hvor A og B hver betegner et hydrogenatom eller tilsammen danner en dobbeltbinding, og -NHR betegner histaminyl, som er mærket med iod-125 eller -131.

2. Radioaktivt stilbenderivat ifølge krav 1, k e n d e - t e g n e t v e d ,

20 at det er

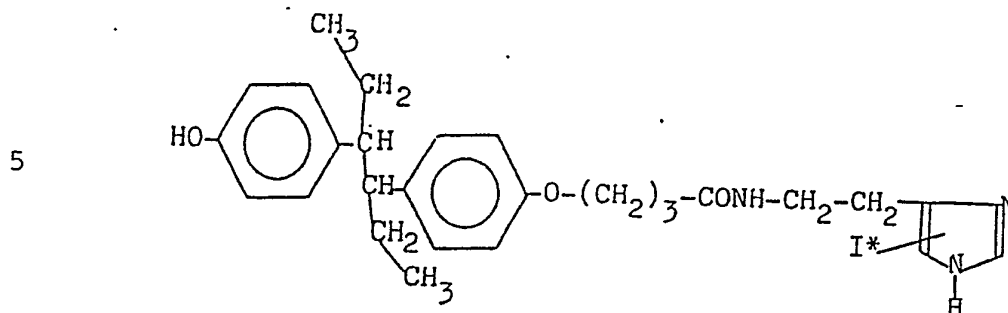
4-0-monocarboxypropyl-dienestrol koblet til ^{125}I -histamin og med formlen

25



hvor tegnet * angiver, at det drejer sig om radioaktivt iod-125, hvilket iod-125 kan være i 2- eller 5-stillingen, eller

35 4-0-monocarboxypropylhexestrol koblet til ^{125}I -histamin og med formlen



10

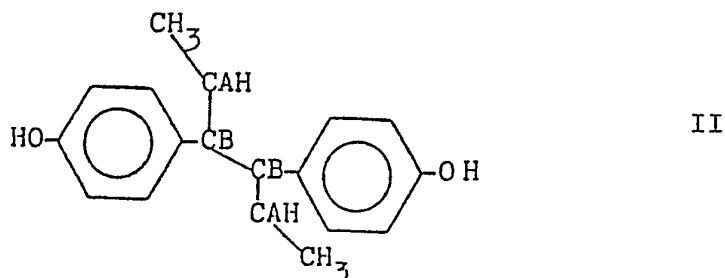
hvor tegnet * angiver, at det drejer sig om radioaktivt iod-125, hvilket iod-125 kan være i 2- eller 5-stillingen.

3. Fremgangsmåde til fremstilling af en forbindelse ifølge krav 1, kendet tegnet ved,

15

- at man omsætter en forbindelse med den almene formel II

20

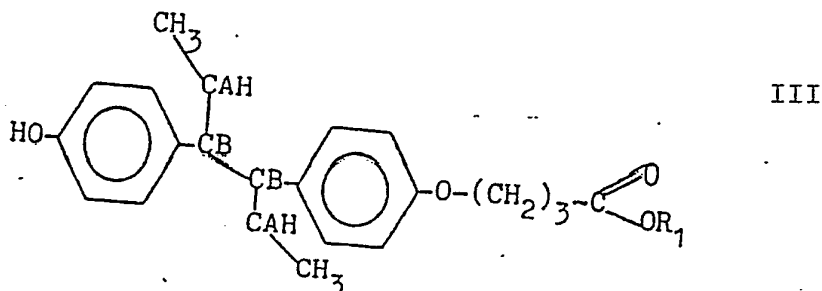


25

hvor - ligesom i det følgende - A og B har den ovenfor angivne betydning, med et alkylhalogenbutyrat i nærværelse af en base til opnåelse af en ether med den almene formel III

30

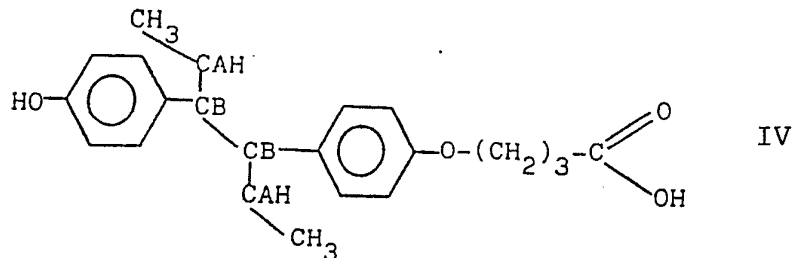
35



- 15 -

hvor R_1 betegner en alkylgruppe med højst 6 carbonatomer, hvori man hydrolyserer estergruppen til opnåelse af en forbindelse med den almene formel IV

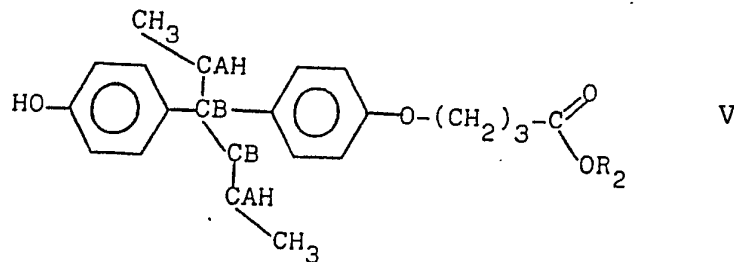
5



10

- hvorpå man til syregruppen af denne forbindelse med formelen IV fikserer en aktivatorgruppe for carbonylgruppen og får en forbindelse med den almene formel V

15



20

25

hvor R_2 betegner en aktivatorgruppe med formelen $-CO-O-Alk$, hvor Alk er en C_1-C_6 -alkylgruppe,

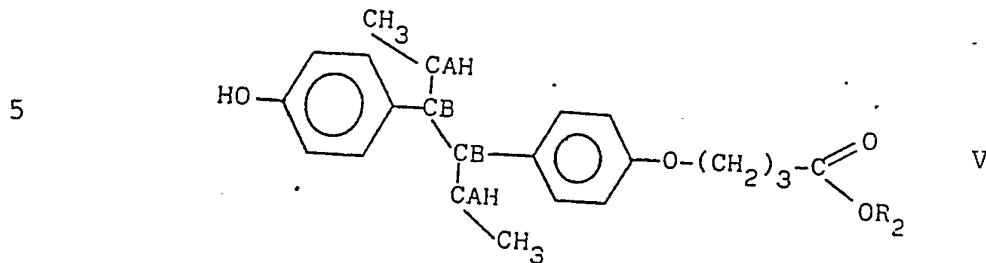
- som man omsætter med iodmærket histamin eller med et derivat deraf og får den ønskede forbindelse med formelen I.

30

35

4. Fremgangsmåde ifølge krav 3, kendt og tegnet ved, at man til syregruppen i forbindelsen med den almene formel IV fikserer aktivatorgruppen for carbonylgruppen, idet man omsætter forbindelsen med formelen IV med et alkylhalogenformiat i nærværelse af en tertiær base i vandfrit miljø og under indifferent atmosfære og får forbindelsen

med den almene formel V



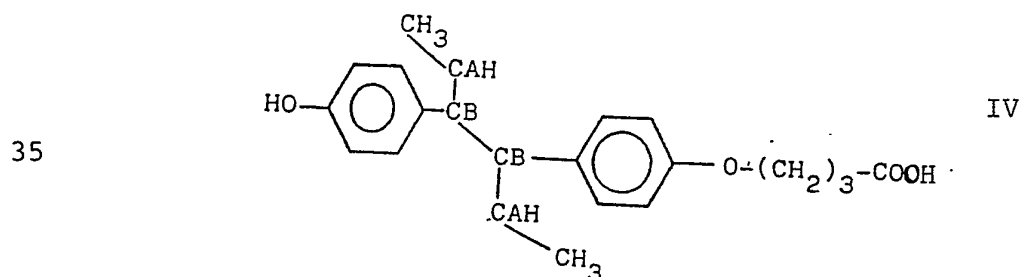
10

hvor R_2 er en aktivatorgruppe med formlen $-\text{CO}-\text{O}-\text{Alk}$, idet Alk betegner en alkylgruppe med højst 6 carbonatomer.

15 5. Fremgangsmåde ifølge krav 3-4, k e n d e t e g n e t ved,

- at det alkylhalogenbutyrat, som man omsætter med forbindelsen med den almene formel II, er ethylbrombutyrat, og at man arbejder i nærværelse af kaliumcarbonat,
 - at man hydrolyserer estergruppen i forbindelsen med den almene formel III ved hjælp af methanolisk natriumhydroxid, og
 - at den forbindelse, som gør det muligt at fiksere en aktiveringsgruppe for carbonylgruppen, og som man omsætter med forbindelsen med den almene formel IV, er isobutylchlorformiat, og at man arbejder i nærværelse af tri-n-butylamin i vandfrit dioxan og under indifferrent atmosfære.
- 20
- 25

30 6. Mellemprodukt til brug ved fremstilling af en forbindelse ifølge krav 1 eller 2, k e n d e t e g n e t ved, at det har den almene formel IV

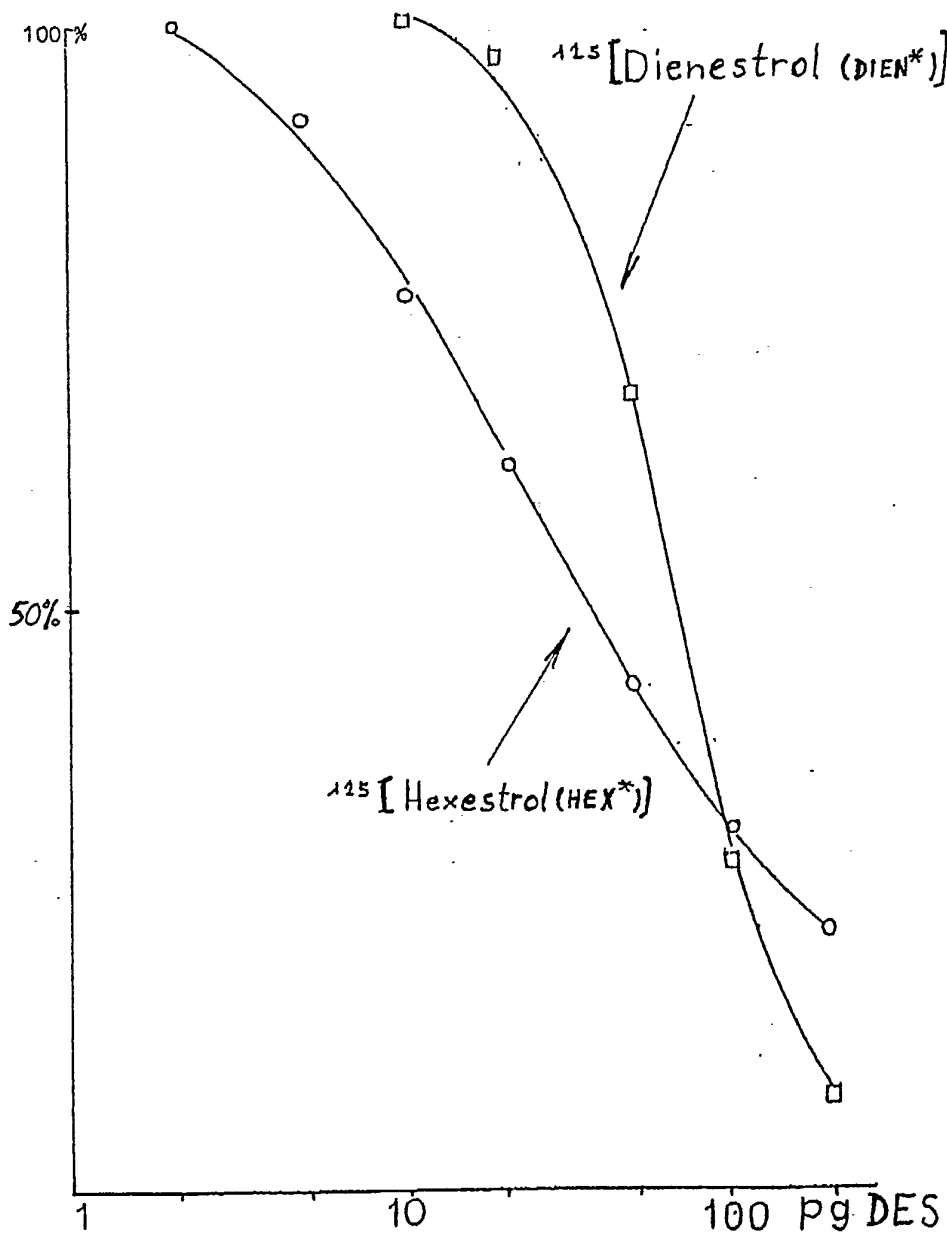


hvor A og B hver betegner et hydrogenatom eller tilsammen
betegner en dobbeltbinding.

5

10

% maksimal binding af etiketteret forbindelse til antistof



Mængde uetiketteret Diethylstilbestrol (DES)

Fig. I