



[B] (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLÄGGNINGSSKRIFT 66593

C (45) Patentti myönnetty 12.11.1984
Patent meddelat

(51) Kv.Kk.³/Int.Cl.³ C 07 C 103/85

SUOMI—FINLAND

(FI).

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(21) Patentihakemus — Patentansökan	770339
(22) Hakemispäivä — Ansökningsdag	31.01.77
(23) Alkuperäinen — Giltighetsdag	31.01.77
(41) Tulot julkiseksi — Blivit offentlig	16.10.77
(44) Näkövirikseksen ja kuul.julkaisun pvm. — Ansökan utlagd och utskriften publicerad	31.07.84

(32)(33)(31) Pyydetty etuoikeus — Begärd prioritet 15.04.76

Saksan Liittotasavalta-Föbundsrepubliken
Tyskland(DE) P 2616724.8

- (71) Boehringer Mannheim GmbH, Sandhofer Strasse 112-132, D-6800 Mannheim-Waldhof, Saksan Liittotasavalta-Föbundsrepubliken Tyskland(DE)
- (72) Hans-Georg Batz, Tutzing, Klaus Stellner, Bernried, Hans-Ralf Linke, Wielenbach, Günter Weimann, Tutzing, Saksan Liittotasavalta-Föbundsrepubliken Tyskland(DE)
- (74) Berggren Oy Ab
- (54) Hydroksi- ja dihydroksifenyylialaniinin N'-(hydroksialkyyl)- ja N'-(di-hydroksialkyyl)amidit, joita voidaan käyttää jodilla merkittyjen reagensien valmistukseen ja menetelmä näiden amidien valmistamiseksi - N'-(hydroksialkyl)- och N'-(dihydroksialkyl)amider av hydroxifenyl- och dihydroksifenylalanin, som kan användas för framställning av reagenser märkta med jod och förfarande för framställning av dessa

Keksintö koskee sellaisten aminohappojen hydroksialkyyliamideja, joita voidaan merkitä jodilla, sekä menetelmää niiden valmistamiseksi.

Kun valmistetaan reagensseja, joita lisätään immunologisissa testeissä vesi- tai fysiologisiin liuoksiin kuten esimerkiksi plasmaan, seerumiin tai virtsaan, niihin käytetään usein radioaktiivisilla aineilla, etupäässä jodi-isotoopeilla ¹²⁵J ja ¹³¹J merkittyyä aineita. Koska jodi-isotooppeja voidaan vain harvoin saada tutkittavan tai määrättävän molekyylin sisään suoraan, ilman että molekyyli muuttuisi palauttamattomasti tai inaktivoituisi, liitetään tutkittavaan aineeseen yleensä helposti joditettavia aineita, kuten esimerkiksi aminohappoja tyrosiinia, dihydroksifenyylialaniinia, 5-hydroksitryptofaania tai histidiiniä, tai niiden johdannaisia kuten estereitä, biogeenisiä amiineja tai hydroksijohdannaisia.

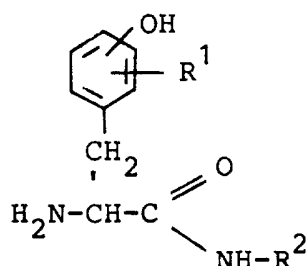
Siten tunnetaan esimerkiksi julkaisusta J. Clin. Investig. 47, sivut 1035-1042, immuunitesti, jonka avulla määrätään digitoksiini ja digoksiini, ja jossa käytetään radioaktiivisella jodilla merkittynä aineena tyrosiinimetyyliesteriä sisältävää yhdistettä.

DE-hakemusjulkaisusta n:o 2 142 421 tunnetaan digitoksigeniini-johdannaisten ja tyrosiinin konjugaatteja, siis konjugaatteja, joissa on vapaa karboksyyli-ryhmä.

Näillä tunnetuilla konjugaateilla on tosin erilaisia varjopuolia. Siten nämä aminohappoestereiden tai biogeenisten amiinien kanssa muodostetut kytkentätuotteet ovat voimakkaasti hydrofobisia ja joko huonosti tai ei lainkaan veteen liukenevia. Konjugaateissa, joissa on vapaa aminohappo, on taas se varjopuoli, että niitä voidaan syntetisoida vain vaikeasti ja saalis on huono, koska aminohappojen liukoisuus orgaanisiin liuottimiin on liian pieni ja koska sitä paitsi on vaikeata suorittaa aminohappo-alempi-alkyyli-estereiden selektiivinen hydrolyysi, kun molekyylissä on toinenkin esteriryhmä. Vapaa karboksyyli-funktio voi lisäksi aiheuttaa ei-toivottuja sivureaktioita tutkittavan koeseerumin kanssa ja joissakin tapauksissa häiritä testiä herkästi.

Keksinnön tarkoituksena on välttää näitä haittoja ja valmistaa veteen ja fysiologisiin nesteisiin hyvin liukenevia hydrofiilisiä, ei-polaarisia aminohappojohdannaisia, joihin voidaan liittää jodia, ja joita voidaan samalla valmistaa taloudellisemmin, koska saalis on parempi, ja jotka soveltuvat immuunitesti-reagenssien valmistukseen.

Tämä tehtävä voidaan ratkaista keksinnön mukaan yleisen kaavan I mukaisilla hydroksi- ja dihydroksifenyyli-alaniinin N'-(hydroksi-alkyyli)- ja N'-(dihydroksialkyyli)amideilla ja niiden vesiliukoisilla suoloilla:



I

jossa R^1 on vetyatomi tai hydroksiryhmä ja R^2 on 1-4 C-atomia sisältävä mono- tai dihydroksialkyyli-ryhmä.

Hydroksifenyyli-ryhmä on edullisesti p-hydroksifenyyli-ryhmä ja dihydroksifenyyli-ryhmä on edullisesti 3,4-dihydroksifenyyli-ryhmä.

Edullisia mono- ja dihydroksialkyyli-ryhmiä ovat esimerkiksi hydroksimetyyli-, 2-hydroksietyyli-, 1,3-dihydroksipropyyli-, 1,4-dihydroksibutyyli- sekä dihydroksi-tert.butyyli-ryhmät. Sopivia vesiliukoisia suoloja ovat mineraalihappojen suolat, mutta helposti kiteytyviä hydrohalogenideja pidetään parhaina.

Erikoisen edullinen keksinnön mukainen yhdiste on N'-(2-hydroksietyyli)-tyrosiiniamidi-hydrokloridi.

Keksinnön mukaiset yhdisteet ovat hydrofiilisiä, veteen ja fysiologisiin nesteisiin helposti liukenevia ja reaktiivisen aminoryhmänsä ansiosta niitä voidaan konjugoida helposti radioaktiivista jodia sisältävien merkkiaineiden, "tracer"-aineiden kanssa, ja soveltuvat varsinkin liitettäväksi happojohdannaisiin, jolloin muodostuu amidisidos, ja siis erikoisen hyvin soveltuvia immunologisia testejä varten tarkoitettujen reagenssien valmistukseen vesi- tai fysiologisissa liuoksissa. Keksinnön mukaiset yhdisteet soveltuvat nimenomaan käytettäväksi sydänglykosidien (digitalisglykosidien) tutkimukseen käytettävien reagenssien valmistukseen. Tätä tarkoitusta varten annetaan keksinnön mukaisten alkyloliamidien reagoida digoksiini-, digoksigeniini-, digitoksiini- tai digitoksigeniini-johdannaisten kanssa, esimerkiksi digoksiini- tai digitoksiinidikarbonihappoestereiden kanssa saksalaisen hakemusjulkaisun n:o P 25 37 129.3 mukaisesti. Kun keksinnön mukaisia yhdisteitä käytetään tällaisten reagenssien valmistukseen, ei esiinny minkäänlaisia ei-toivottuja sivureaktioita, esimerkiksi radioimmuunitestissä koeseerumin kanssa, mm. sen vuoksi, ettei keksinnön mukaisten alkyloliamidien molekyylissä ole mitään vapaata karboksyyli-ryhmää.

Kaavan I mukaisia yhdisteitä voidaan valmistaa siten, että ensin suojataan sinänsä tunnetulla tavalla hydroksifenyylialaniinilähtöaineen aminoryhmä, sen jälkeen esteröidään karboksyyli-ryhmä reaktiivisella, aminolyyttisesti lohkaistavalla yhdisteellä ja näin saadun esterin annetaan reagoida ryhmän R^2 sisältävän alkanoliamiinin kanssa, jolloin saadaan vastaava amidi, lohkaistaan suojaryhmä happamassa väliaineessa tai pelkistämällä, ja muutetaan saatu amidi mahdollisesti vesiliukoiseksi suolaksi.

Tämä menetelmä käsittää yksityiskohtaisemmin sen, että suojaryhmänä

käytetään tunnetulla tavalla trifluoriasetyyli-, karbobentsoksi- tai trityyliryhmää ja reaktiokykyisenä, aminolyyttisesti lohkaistavana yhdisteenä hydroksiasetonitriili-, hydroksisukkinimidi- tai N-hydroksibentstriatsoliesteriä, joita valmistetaan ennestään tunnetuilla tavoilla hapoista ja hydroksiyhdisteistä tai happojen alkalisuoloista ja esimerkiksi klooriasetonitriilistä, hydroksisukkinimidisulfonaatista, N-hydroksibentstriatsoli-tosylaattista, N-hydroksibentstriatsolitrifluorimetyylisulfonaatista tai 2,4,5-trikloorifenyyli-sulfonaatista.

Keksintöä valaistaan seuraavien esimerkkien avulla.

Esimerkki 1 - N'-(2-hydroksietyyli)-tyrosiiniamidi-hydrokloridi

a) F. Weygandin ja R. Geigerin alkuperäisen kirjallisuuslähteen mukaisesti, Chem. Ber. 89, sivu 647 (1956) valmistettiin N-trifluoriasetyylityrosiinia antamalla tyrosiinin reagoida trifluorietikkahappoanhydridin kanssa trifluorietikkahapon ja dietyylieetterin seoksessa.

b) Liuokseen, jossa oli 10 g (36 mmoolia) trifluoriasetyylityrosiinia ja 4,6 g (40 mmoolia) N-hydroksisukkinimidia absoluuttisessa tetrahydrofuraanissa, tiputettiin sekoittaen ja jäädytettiin jäissä liuos, joka sisälsi 8,5 g (41,2 mmoolia) disykloheksyylikarbodiimidiä absoluuttisessa tetrahydrofuraanissa. Tämän jälkeen sekoitettiin 12 h ajan huoneenlämmössä, sen jälkeen suodatettiin saostunut disykloheksyylivirtsa-aine erilleen, suodos haihdutettiin ja liuotettiin etyyliasetaattiin. Etyyliasetaattiliuos ravisteltiin vedellä, bikarbonaattiliuoksella ja jälleen vedellä, kuivattiin natriumsulfaatin kanssa ja haihdutettiin kuiviin. Jäljelle jäävä N-trifluoriasetyylityrosyyli-hydroksisukkinimidi-esteri kiteytettiin uudelleen petrolieetteristä. Saalis: 11,3 g (84 % teor.), sp. 145-147°C.

Analyysi:

	C	H	N
$C_{15}H_{13}O_6N_2F_3$ (374,27) laskettu:	48,14	3,50	7,48
saatu :	48,68	3,23	7,28

c) 7,6 g (20,3 mmoolia) N-trifluoriasetyyli-tyrosyyli-hydroksisukkinimidiesteriä liuotettiin 60 ml:aan dioksaania ja lisättiin liuos, jossa on 2,1 g (34,4 mmoolia) etanoliamiinia vedessä. Liuoksen pH säädettiin sitten 5-prosenttisella K_2CO_3 -liuoksella arvoon

7,5 ja sitä sekoitettiin 4 päivän ajan huoneenlämmössä. Tämän jälkeen liuos haihdutettiin kuiviin, jäännös liuotettiin metanoliin ja fraktioitiin piihappogeeli-pylväässä (eluoointiaine: metanoli/kloroformi-seos 1:1). Yhdenmukaiset ainefraktiot haihdutettiin kuiviin ja uudelleenkiteytettiin eetteristä. Saalis: 3,9 g (45 % teor.) N-trifluoriasetyyli-tyrosyyli-etanoliamidia, sp. 153-155°C.

Analyysi:	C	H	N
$C_{13}H_{15}O_4N_2F_3$ (320,27) laskettu:	48,75	4,72	8,74
saatu:	47,91	4,07	8,40

d) 4,3 (13,4 mmoolia) N-trifluoriasetyyli-tyrosyyli-etanoliamidia liuotettiin 30 ml:aan abs. etanolia ja lisättiin 2 g (53 mmoolia) natriumboorihydridiä ja sekoitettiin 1 h. Sen jälkeen lisättiin 30 ml asetonia ja sekoitettiin edelleen 30 min. Reaktioliuos haihdutettiin kuiviin, liuotettiin veteen ja sitä ravisteltiin pienen määrän kanssa etyyliasetaattia. Vesiliuos haihdutettiin kuiviin ja jäännös liuotettiin etanolin ja kloroformin seokseen, suodatettiin ja haihdutettiin kuiviin. Jäännös liuotettiin etanoliin. Tähän liuokseen johdettiin kloorivetyä, jolloin saostui tyrosyylietanoliamidin hydrokloridia. Saalis: 2,5 g (70 % teoreettisesta määrästä). Sp. 220-225°C (hajosi).

Esimerkin 1 mukaisen yhdisteen käyttäminen sydänglykosidien tutkimuksessa käytettävän reagenssin valmistamiseen, joka voidaan merkitä radioaktiivisella jodilla:

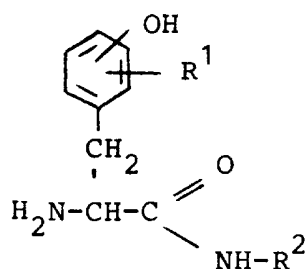
Digoksiini-4'''-glutaryyli-N'-(2-hydroksietyyli)-tyrosiiniamidin valmistaminen
200 mg digoksiini-4'''-glutaryyli-hydroksisukkinimidiesteriä, joka on valmistettu saksalaisen patenttihakemuksen n:o P 25 37 129.3 esimerkin 4 mukaan, liuotettiin 20 ml:aan absoluuttista etanolia ja lisättiin 60 mg esimerkin 1 mukaan valmistettua tyrosyylietanoliamidi-hydrokloridia 5 ml:ssa vettä. Liuoksen pH säädettiin sitten 5-prosenttisella K_2CO_3 -liuoksella arvoon 8,0 ja liuosta sekoitettiin 3 päivää huoneenlämmössä. Sen jälkeen haihdutettiin kuiviin, liuotettiin jäännös absoluuttiseen etanoliin, suodatettiin ja haihdutettiin uudelleen kuiviin. Kun jäännöksenä olevaan öljyyn lisättiin vettä, saostui tuote sakkana, joka suodatettiin ja kuivattiin. Puhdistamista varten liuotettiin tuote etanolin ja etyyliasetaatin seokseen ja kromatografoitiin piihappogeelipylväässä. Epäpuhtaudet eluoitiin etyyliasetaatilla, puhdas tuote etanolilla.

Saalis:	135 mg (63 % teor.)		
Analyysi:	C	H	N
$C_{57}H_{85}N_2O_{19}$ (1.101) laskettu:	62,1	7,7	2,5
saatu :	60,84	7,78	2,21

Näin valmistettu digoksiini-4'''-glutaryyli-tyrosyyli-etanoli-amidi on, sen jälkeen kun se on tavanmukaisin menetelmin merkitty radioaktiivisella ^{125}J :llä, erinomainen ei-polaarinen reagenssi, jolla digoksiini voidaan määrätä vesi- tai fysiologisessa liuoksessa.

Patenttivaatimukset

1. Hydroksi- ja dihydroksifenyylialaniinin N'-(hydroksialkyyli)- ja N'-(dihydroksialkyyli)amidit, joita voidaan käyttää jodilla merkittyjen reagenssien valmistukseen, ja joilla on kaava



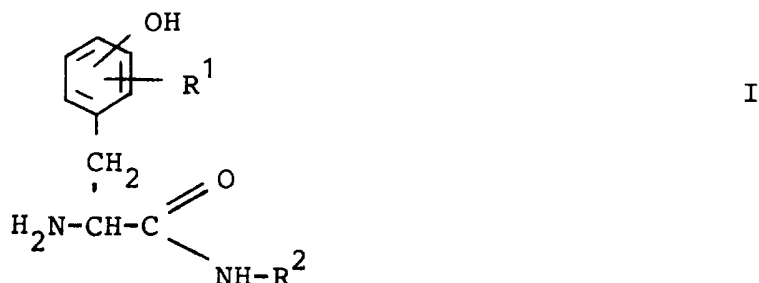
jossa R^1 on vetyatomi tai hydroksiryhmä ja R^2 on 1-4 C-atomia sisältävä mono- tai dihydroksialkyyli-ryhmä, sekä niiden vesiliukoiset suolat.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen yhdiste, t u n n e t t u siitä, että se on N'-(2-hydroksietyyli)-tyrosiiniamidi-hydrokloridi.

3. Menetelmä patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukaisten yhdisteiden valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että ensin suojataan siinänsä tunnetulla tavalla hydroksifenyylialaniini-lähtöaineen aminoryhmä, sen jälkeen esteröidään karboksyyli-ryhmä reaktiokykyisellä, aminolyyttisesti lohkaistavalla yhdisteellä ja näin saadun esterin annetaan reagoida ryhmän R^2 sisältävän alkanoliamiinin kanssa, jolloin saadaan vastaava amidi, lohkaistaan suojaryhmä happamassa väliaineessa tai pelkistämällä, ja muutetaan saatu amidi mahdollisesti vesiliukoiseksi suolaksi.

Patentkrav

1. N'-(hydroxialkyl)- och N'-(dihydroxialkyl)amider av hydroxifenyl- och dihydroxifenylalanin, som kan användas för framställning av reagenser märkta med jod, och som har formeln



vari R^1 är en väteatom eller en hydroxigrupp och R^2 är en mono- eller dihydroxialkylgrupp med 1-4 C-atomer, samt vattenlösliga salter därav.

2. Förening enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a d av att den utgöres av N'-(2-hydroxietyl)-tyrosinamid-hydroklorid.

3. Förfarande för framställning av föreningar enligt patentkravet 1 eller 2, k ä n n e t e c k n a t av att man först på i och för sig känt sätt skyddar aminogruppen i hydroxifenylalanin-utgångsmaterialet, därefter förestarr karboxylgruppen med en reaktiv, aminolytiskt avspaltbar förening och omsätter den sålunda erhållna estern med en alkanolamin innehållande gruppen R^2 , varvid man erhåller motsvarande amid, avspaltar skyddsgruppen i ett surt medium eller medelst reduktion, och överför den erhållna amiden möjligen i ett vattenlösligt salt.

Viitejulkaisuja-Anförda publikationer

-