



NORGE

(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **303657**

(13) B1

(51) Int Cl⁶ G 01 N 33/533, 33/58

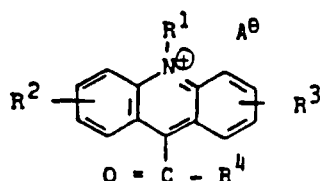
Patentstyret

(21) Søknadsnr	19923800	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	
(22) Inng. dag	30.09.1992	(85) Videreføringsdag	20.02.1988, DE, 3805318
(24) Løpedag	17.02.1989	(30) Prioritet	
(41) Alm. tilgj.	21.08.1989		
(45) Meddelt dato	10.08.1998		
(62) Avdelt fra	19890689		
(73) Patenthaver	Hoechst AG, D-65926 Frankfurt am Main, DE		
(72) Oppfinner	Tonio Kinkel, Frankfurt am Main, DE Peter Molz, Mainz, DE Erwin Schmidt, Kelkheim, DE Gerd Schnorr, Bad Vilbel, DE Heinz Jürgen Skrzipczyk, Bad Soden, DE		
(74) Fullmektig	Kari O. Hanssen, Bryns Patentkontor AS, 0106 Oslo		

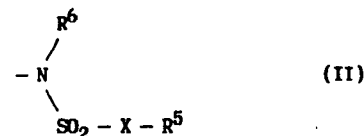
(54) **Benevnelse** Fremgangsmåte for fremstilling av en luminiscent forbindelse samt anvendelse av den fremstilte forbindelsen i en luminiscens-immunoanalyse for bestemmelse av et antigenisk stoff i en væskeprøve

(56) **Anførte publikasjoner** NO B 177639

(57) **Sammendrag** Det er beskrevet en fremgangsmåte for fremstilling av en luminiscent forbindelse hvorved et akridiniumderivat av formel I



(I) hvori R⁴ utgjør en rest av formel I eller II



og hvori A⁻ er et anion som ikke påvirker kjemiluminiscensen, R¹ er hydrogen, en alkyl-, alkenyl- eller alkinylrest med 1-4 karbonatomer, en benzyl- eller arylgruppe, R² og R³ er hydrogen, en alkylgruppe med 1-4 karbonatomer, en substituert eller usubstituert aminogruppe, en karboksy-, alkoksy-, cyano-, nitrogruppe eller halogen, R⁵ er en reaktiv gruppe som under skånende betingelser selektivt kan inngå en binding med amino-, karboksy-, tiol- eller andre funksjonelle grupper i stoffer av biologisk interesse, R⁶ kan ha flere betydninger og f.eks. stå for hydrogen, en alkyl-, alkenyl- eller alkoksylrest med 1 til 10 C-atomer, bindes til et protein, et polypeptid eller til et annet stoff av biologisk interesse under dannelse av et stabilt immunologisk aktivt konjuget.

Det er videre beskrevet en luminiscens-immunoanalyse for bestemmelse av et antigenisk stoff i en væskeprøve.

Foreliggende oppfinnelse vedrører en fremgangsmåte for fremstilling av en luminiscent forbindelse samt anvendelse av den fremstilte forbindelsen i en luminiscens-immunoanalyse for bestemmelse av et antigenisk stoff i en væskeprøve.

5

Luminiscerende forbindelser har allerede mangfoldige anvendelser. De anvendes som indikatorer i bioanalyser, enzymimmunoanalyser og luminiscens-immunoanalyser (kfr. W.P. Collins "Alternative Immunoassays", John Wiley & Sons Ltd., Chichester, 1985), men anvendes også i nukleinsyre-hybridiseringsanalyser (kfr. J.A. Matthews et al., "Analytical Biochemistry", 151, 205-209, 1985). Videre anvendes kjemiluminiscerende forbindelser ved "flow injection analysis", i etter-kolonne-detektorer innenfor væskekromatografi, innenfor strømningsforskning og kunstige lyskilder.

15

Ved kjemiluminiscens-immunoanalyser har spesielt to strukturtyper av kjemiluminiscerende merkestoffer fått stor betydning. Det dreier seg på den ene siden om luminol- hhv. isoluminolderivatene som er beskrevet hos H.R. Schroeder et al., "Methods in Enzymology", Academic Press Inc., New York, bind LVII, 1978, 424 ff, samt i de britiske patentene 2 008 247 og 2 041 920, de tyske patentskriftene 26 18 419 og 26 18 511, samt i den europeiske patentpublikasjonen 135 071. En oversikt over den praktiske anvendelsen av isoluminolforbindelsene som luminiscens-indikatorer finner man hos W.G. Wood, J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 22, 1984, 905-918.

25

På den annen side har også akridiniumesterforbindelser funnet anvendelse som kjemiluminiscerende merkestoff. Slike akridiniumestere er kjente fra US-PS 3 352 791, de britiske patentene 1 316 363 og 1 461 877, samt fra den europeiske patentpublikasjonen 82 636. Anvendelsen av akridiniumesteren som merkestoff innenfor immunanalyser er beskrevet av Weeks et al., Clin. Chem. 29/8 (1983), 1474-1479. Også anvendelsen av fenantridiniumestere som merkestoff i luminiscens-

35

immunoanalyser er allerede kjent fra den europeiske patentpublikasjonen 170 415.

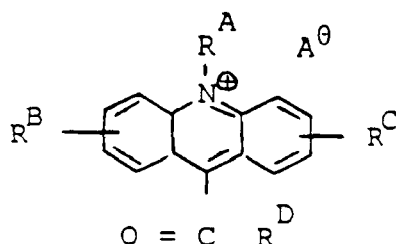
5 Kjemiluminiscensen av akridiniumestere kan startes ved tilsats av alkalisk H_2O_2 -oppløsning. Vedrørende mekanismen for kjemiluminiscens har F. McCapra, Acc. Chem. Res. 9, 201, 1976, gitt en overbevisende forklaring. Derav er det åpenbart at typen av avspaltbar gruppe er av avgjørende betydning, både for lyskvanteutbyttet og også for den
10 hydrolytiske stabiliteten.

De allerede kjente akridiniumesterene har sammenlignet med luminol- og isoluminolforbindelser den fordel at de gir et høyere lyskvanteutbytte, som heller ikke påvirkes av
15 proteiner bundet til indikatoren (kfr. Weeks et al., Clin. Chem. 29/8 (1983), 1474-1479).

Selv om de fra det europeiske patent 82 636 kjente akridiniumfenylesterene utmerker seg ved en høy påvisningsfølsomhet ved fremkalling av kjemiluminiscensen ved hjelp av milde
20 oksydasjonsmidler, oppviser de forstyrrende ulemper for den praktiske anvendelsen. Først og fremst er fenylesterbindingen meget labil i vandige systemer, allerede ved romtemperatur. Hertil kommer at akridiniumfenylesteren under de der angitte oksydasjonsbetingelsene oppviser en lysemmissjon som
25 først i stor grad er opphørt etter ca. 10 sekunder, dvs. i et omfang på over 95%. Sammenlignet med dette har andre, ikke isotopiske analysefremgangsmåter, langt kortere måletider og muliggjør dermed en høyere prøvegjennomgang.

30

Det er allerede foreslått å anvende kjemiluminiscerende akridiniumderivater som ved høyere lyskvanteutbytte oppviser en raskere reaksjonskinetikk og dermed kortere måletider for en luminiscens-immunoanalyse (kfr. tysk patentpublikasjon P
35 36 28 573.0). Det dreier seg derved om akridiniumderivater av formelen

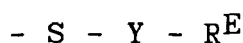


5

10

15

hvor R^A er hydrogen, en alkyl-, alkenyl- eller alkynylrest med 1 til 10 karbonatomer, en benzyl- eller arylgruppe, R^B og R^C er hydrogen, en alkylgruppe med 1 til 4 karbonatomer, en substituert eller usubstituert aminogruppe, en karboksy-, alkoksy-, cyano-, nitrogruppe eller halogen, R^D utgjør en rest hvori en sulfonamidgruppe er bundet direkte via nitrogenet til karbonylgruppen, eller er en tioalkyl- eller tioarylrest av formelen



20

25

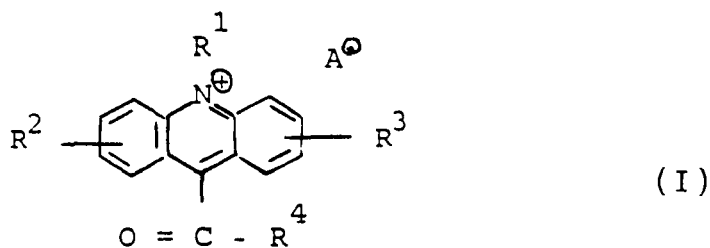
hvor Y er en forgrenet eller uforgrenet alifatisk eller en aromatisk gruppe, som også kan inneholde heteroaromater, og R^E er en reaktiv gruppe som under skånende betingelser selektivt kan inngå en binding med amino-, karboksy-, tiol- eller andre funksjonelle grupper i stoffer av biologisk interesse, og A^- er et anion som ikke påvirker kjemiluminescensen.

30

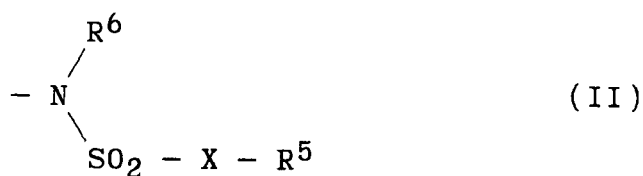
Det har nå vist seg at spesielle akridiniumderivater, p.g.a. sin fremragende stabilitet og uventet høye påvisningsfølsomhet, egner seg spesielt for anvendelse som kjemiluminescerende forbindelser.

35

Oppfinnelsens gjenstand er følgelig en fremgangsmåte for fremstilling av en luminiscent forbindelse, kjennetegnet ved at et akridiniumderivat med formel I



hvori R^1 er metyl,
 R^2 og R^3 er hydrogen,
 R^4 er en rest av formelen II eller III



hvori R^5 er suksinimidoyloksykarbonyl,
 R^6 er fenyl, mono- eller disubstituert med alkyl eller
 alkoksy med 1 til 4 C-atomer, eller fenyl som inneholder en
 etylendioksysubstituent, eller fenyl som er substituert med
 N-metyl-morfolino-N-2-etoksy,
 X er p-fenylalkylen, hvorved alkylenkjeden inneholder 1-4 C-
 atomer, direkte eller via et bromoketyl, bindes til et
 protein, et polypeptid eller til et annet stoff av biologisk
 interesse under dannelse av et stabilt, immunologisk aktivt
 konjugat.

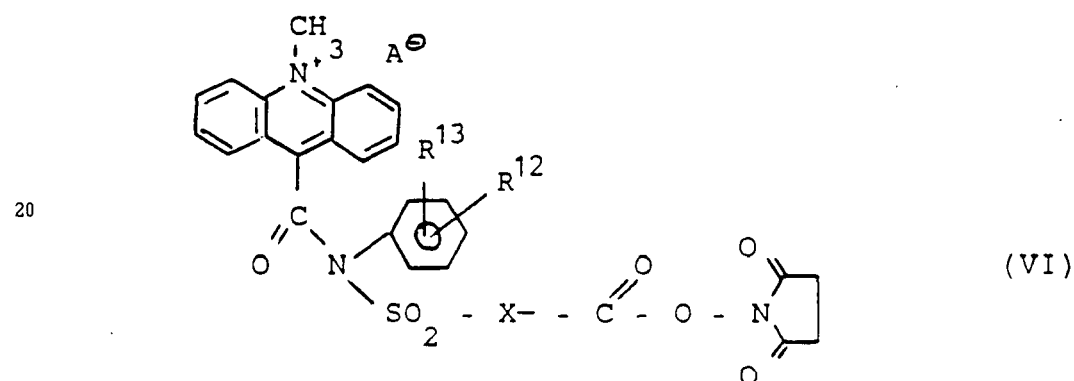
Under stoffer av biologisk interesse forstås fremfor alt
 antigener. Under dette begrepet faller f.eks. hormoner,
 steroider, legemidler, legemiddelmetabolitter, toksiner,
 alkaloider og også antistoffer.

Som aminokarboksylysyrer egner seg f.eks. glycin, alanin, serin, fenylalanin, histidin, α -aminosmørsyre, metionin, valin, norvalin, leucin, iso-leucin, norleucin, asparaginsyre, glutaminsyre, 4-aminobenzosyre, 4-aminofenyleddiksyre, 4-aminofenoksyeddiksyre og 3-(4-amino)fenylpropionsyre.

Anioner som ikke påvirker kjemiluminiscensen kan f.eks. være et tetrafluorborat-, perklorat-, halogenid-, alkylsulfat-, halogensulfat-, alkylsulfonat- eller arylsulfonat-anion. Også et hvert annet anion kan anvendes, så fremt det ikke slukker eller svekker kjemiluminiscensen.

Videre har akridiniumderivater av formel VI vist seg spesielt egnede. Formel VI er

15



25

hvor X er en gruppe av formelen VII

30



35

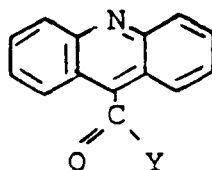
med $n = 2$ eller 4
og R^{12} og R^{13} er uavhengig av hverandre hydrogen, en alkylgruppe. Disse forbindelsene utgjør lett vannoppløslige produkter.

Det er overraskende, at på amidnitrogen sulfonyl-substituerte akridinium-9-karboksytsyreamider oppviser en utmerket kjemiluminiscens, idet det er kjent at akridinium-9-karboksytsyreamider i motsetning til akridinium-9-karboksytsyreesterene ikke oppviser noen kjemiluminiscens (kfr. F. McCapra i W. Carruthers og J.K. Sutherland: "Progress in Organic Chem.", bind 8, 231-277, 1973, Butterworth, London).

En betydelig fordel ved akridiniumforbindelsene ifølge oppfinnelsen sammenlignet med de fra den europeiske patent-søknaden 82 636 kjente akridiniumfenylesterene ligger i den vesentlig raskere reaksjonskinetikken for lysemissjonen (kfr. P 36 28 573.0).

Et lignende resultat får man ved det tilsvarende forsøket ved 4°C. Figur 2 viser signalintensiteten etter lagring ved 4°C. Igjen viser traceren fremstilt fra forbindelse a) seg som betydelig mer stabil enn den som er fremstilt fra forbindelse c).

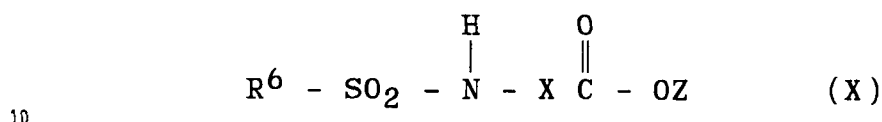
For fremstilling av akridinium-sulfonamidderivatene ifølge oppfinnelsen kan man gå ut fra akridin-9-karboksytsyreklorid (IX). For å fremstille dette omsettes f.eks. akridin ved den av Lehmstedt og Hundertmark i Ber. 63, 1229 (1930) angitte fremgangsmåte i etanol/iseddik med kaliumcyanid til 9-cyanakridin. Herav utvinnes, fortrinnsvis etter omkrystallisasjon, ved omsetning med svovelsyre og natriumnitrit tilsvarende fremgangsmåten beskrevet av Lehmstedt og Wirth i Ber. 61, 2044 (1928) akridin-9-karboksylsyren. Ved omsetning av akridin-9-karboksylsyren, f.eks. med tionylklorid oppnås forbindelsen av formel IX



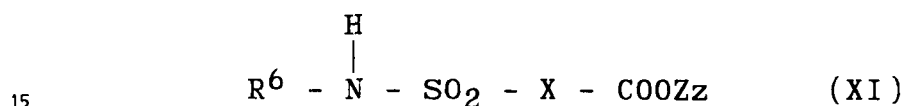
(IX)

hvor i Y har betydningen klor. Istedet for et halogen kan i forbindelsen IX for Y også innføres en oksykarbonylalkyl-, oksykarbonylaryl- eller imidazolidgruppe.

- 5 Syrekloridet (IX) lar seg deretter omsette med en beskyttet sulfonamidkarboksylsyre av formel X



eller av formel XI



hvor i X og R^6 har de ovenfor angitte betydningene og Z står for en rest som beskytter karboksylgruppen som senere avspaltes. Eksempelvis kan man for denne reaksjonen anvende
 20 N-(4-benzoksykarbonylfenyl)-N-4-toluensulfonsyreamidet. Fordelaktig er anvendelsen av t-butylester, hvis beskyttelsesgruppe kan innføres og igjen avspaltes, under spesielt skånsomme betingelser. Syren som oppstår etter avspaltningen av beskyttelsesgruppen kan deretter, med en egnet forbindelse, eksempelvis med N-hydroksysuksinimid, overføres til
 25 resten R^5 . Herav oppnås den kjemiluminiserende akridinforbindelsen ved alkylering på nitrogen i 10-stilling.

De oppnådde akridiniumforbindelsene lar seg deretter omsette
 30 med et stoff av biologisk interesse, f.eks. et antigen, et antistoff, et hormon, et legemiddel, en legemiddelmetabolit, et toksin eller et alkaloid til en luminiserende forbindelse. Derved bindes akridiniumderivatet enten direkte eller via et bromoketyl som f.eks. aminosyrer, oligo- eller
 35 polyamino-syrer, peptider eller syntetiske polymerer, til det biologisk interessante stoffet under dannelse av et stabilt, immunologisk aktivt konjugat. Dette konjugatet betegnes også

som tracer og anvendes i de nedenfor omtalte luminiscens-immunoanalysene.

5 Oppfinnelsen vedrører videre anvendelse av minst en lumini-
scent forbindelse oppnådd som beskrevet ovenfor sammen med
minst en immunologisk aktiv komponent immobilisert på en fast
fase i en kompetitiv- eller en sandwich-fremgangsmåte for be-
stemmelse av et antigenisk stoff i en væskeprøve ved
luminiscens-immunoanalyse.

10

Etter avslutning av immunreaksjonen og eventuelt påkrevde
vasketrinn, utløses lysemissjonen ved suksessiv eller
samtidig tilsats av en eller flere reagenser, hvorved minst
en reagens inneholder et oksydasjonsmiddel i bundet eller
15 ubundet form. Luminiscens-immunoanalysen kan så gjennomføres
på forskjellige måter.

En mulighet består i at man inkuberer det med antigenet
spesifikt reagerende immobiliserte antistoffet med en prøve
20 av væsken som skal undersøkes og et konjugat av antigenet og
et kjemiluminiserende akridiniumderivat (antigen-tracer),
adskiller prøven og den ikke bundne traceren, bringer den
bundne traceren sammen med nødvendige reagenser for å
fremkalle en lysemmisjon, og deretter bestemmer mengden av
25 det tilstedeværende antigenet fra den målte styrken av
lysemmisjonen.

En annen mulighet for gjennomføringen av luminiscens-
immunoanalyser består i at man inkuberer et med antigenet
30 spesifikt reagerende immobilisert antistoff med en prøve av
væsken som skal undersøkes med et konjugat av et andre,
spesifikt reagerende antistoff og et kjemiluminiserende
akridiniumderivat, adskiller prøven og det ikke bundne,
merkede konjugatet, bringer det bundne, merkede konjugatet
35 sammen med de nødvendige reagensene for å fremkalle en
lysemissjon, og bestemmer mengden av det tilstedeværende
antigenet fra den målte styrken av lysemissjonen.

De ovenfor nevnte luminiscens-immunoanalysene kan også gjennomføres på en slik måte at man før tilsatsen av det merkede konjugatet fraskiller væsken som skal undersøkes fra immobilisert antistoff.

En annen luminiscens-immunoanalyse som kan gjennomføres ifølge oppfinnelsen er ikke antistoffet, men derimot antigenet, immobilisert. Følgelig kan et med antistoffet spesifikt reagerende immobilisert antigen inkuberes med en prøve av væsken som skal undersøkes og en oppløsning av et konjugat av antistoffet og et kjemiluminiserende akridiniumderivat, deretter adskilles prøven og det ikke bundne, merkede konjugatet og deretter bringes det bundne, merkede konjugatet sammen med de nødvendige reagensene. Derved opptrer en lysemmisjon fra hvis styrke gjenspeiler mengden av det tilstedeværende antigenet som bestemmes.

En ytterligere variant består i at man immobiliserer et med antistoffet spesifikt reagerende, immobilisert antigen med en oppløsning av et konjugat av antistoffet og et kjemiluminiserende akridiniumderivat, fraskiller det ikke omsatte, merkede konjugatet, tilsetter en prøve av væsken som skal undersøkes, deretter igjen fraskiller prøven, bringer det bundne, merkede konjugatet sammen med de nødvendige reagensene for å fremkalle en lysemmisjon og fra denne deretter bestemme mengden av det tilstedeværende antigenet.

Endelig kan luminiscens-immunoanalysen også gjennomføres ved at man inkuberer et med antistoffet spesifikt reagerende, immobilisert antigen med en oppløsning av et konjugat av antistoffet og et kjemiluminiserende akridiniumderivat, tilsetter en prøve av væsken som skal undersøkes, fraskiller prøven og konjugatet som ikke er bundet, bringer det bundne, merkede konjugatet sammen med de nødvendige reagensene, og deretter, fra den målte lysemmisjonen, bestemmer mengden av det tilstedeværende antigenet.

Oppfinnelsen belyses nærmere ved hjelp av de etterfølgende eksemplene.

5 **Eksempel 1:**

N-(4-metoksyfenyl)-N-[4-(2-benzyloksykarbonyletyl)benzensulfonyl]akridin-9-karboksytsyreamid (3)

17 g 4'-[N-(4-metoksyfenyl)sulfamido]-3-fenylpropionsyre-
10 benzylester (1) i 400 ml diklormetan blandes med 460 mg 4-(N,N-dimetylamino)pyridin og 22,1 ml trietylamin, etter 10 minutter tilsettes det 11,12 g akridin-9-karboksytsyrekloridhydroklorid (2) og det oppvarmes i 6 timer til tilbakesløp. Den avkjølte oppløsningen sammenrøres i kort tid med 2 N
15 NaOH, den fraskilte organiske fasen vaskes med H₂O, tørkes over magnesiumsulfat og inndampes. Resten renses ved søylekromatografi.

Utbytte: 60%. Smeltepunkt: 130-132°C.

20 NMR (DMSO, 100 MHz): δ = 2,7-3,0 ppm (d, br, 2H), δ = 3,0-3,3 ppm (d, br, 2H), δ = 3,5 ppm (s, br, 3H), δ = 5,1 ppm (s, 2H), δ = 6,5 ppm (d, br, 2H), δ = 7,1 ppm (d, br, 2H), δ = 7,35 ppm (s, 5H), δ = 7,5-8,3 ppm (m, 12H).

25 N-(4-metoksyfenyl)-N-[4-(2-karboksyetyl)benzensulfonyl]-akridin-9-karboksytsyreamid-hydrobromid (4)

6,3 g (3) oppvarmes i 30 ml 33% HBr/iseddik i 2 timer til 60°C, etter avkjøling tilsettes 60 ml diisopropyleter,
30 bunnfallet frasuges og det tørkes i vakuum:

Utbytte: 90%. Smeltepunkt: dekomponering 237°C.

NMR (DMSO, 100 MHz): δ = 2,7 ppm (d, br, 2H), δ = 3,1 ppm (d, br, 2H), δ = 3,5 ppm (s, br, 3H), δ = 6,5 ppm (d, br, 2H),
35 δ = 7,0-8,4 ppm (m, 15H).

N-(4-metoksyfenyl)-N-[4-(2-suksinimidoyloksykarbonyletyl)-benzensulfonyl]akridin-9-karboksylsyreamid (5)

3,1 g (4) i 50 ml tetrahydrofuran blandes med 1,41 ml trietylamin, avkjøles til -20°C og blandes med 0,474 ml klormaursyreetyler. Det omrøres i 20 minutter, tilsettes 575 mg N-hydroksysuksinimid, omrøres i 3 timer ved -20°C og får over natten, under omrøring, oppvarmes til romtemperatur. Bunnfallet frasuges, filtratet inndampes, resten opptas i diklormetan eller etylacetat, den resulterende oppløsningen vaskes med vann, NaHCO_3 -oppløsning og vann og tørkes over MgSO_4 . Den organiske fasen inndampes og resten omkrystalliseres fra toluen.

Utbytte: 50%.

NMR (DMSO, 100 MHz) δ = 2,8 ppm (s, 4H), δ = 3,2 ppm (s, br, 4H), δ = 3,5 ppm (s, br, 3H), δ = 6,5 ppm (d, br, 2H), δ = 7,2 ppm (d, br, 2H), δ = 7,6-8,4 (m, 12H)
IR: 3400 cm^{-1} (br), 3060, 2930, 1815 (w), 1780 (w), 1740 (s), 1690 (m), 1600 (w), 1510 (m), 1370 (m), 1250 (m), 1203 (m), 1175 (m).

N-(4-metoksyfenyl)-N-[4-(2-suksinimidoyloksykarbonyletyl)-benzensulfonyl]-10-metylakridinium-9-karboksylsyreamid-fluorsulfonat (6)

1,27 g (5) i 60 ml diklormetan blandes ved -20°C med 0,4 ml metylfluorsulfonat. Det omrøres i 2 timer ved -20°C og opptines over natten til romtemperatur. Etter tilsats av toluen utfelles et gult faststoff som frasuges og tørkes i vakuum.

Utbytte: 80%.

NMR (DMSO, 100 MHz): δ = 2,9 ppm (s, 4H), δ = 3,2 ppm (s, br, 4H), δ = 3,5 ppm (s, br, 3H), δ = 4,8 ppm (s, br, 3H), δ = 6,5 ppm (br, 2H), δ = 7,2 ppm (br, 2H), δ = 7,6-9,0 ppm (m, 12H)

IR = 3400 cm^{-1} (br), 3160, 2970, 1810 (w), 1785 (w), 1740 (s), 1695 (m), 1600 (w), 1555 (w), 1510 (m), 1370 (m), 1290 (m), 1250 (m), 1210 (m), 1170 (m)

Massespektrum: m/Z: 652 M^+ (kation)

5

Eksempel 2:

Fremstillingen av N-(4-metoksyfenyl)-N-[4-(4-suksinimidoyloksykarbonylbutyl)benzensulfonyl]-10-metylakridinium-9-karboksylsyreamid-fluorsulfat (11) med utgangspunkt fra 4'-[N-(4-metoksyfenyl)sulfamido]-5-fenylvaleriansyrebenzylester (7) og akridin-9-karboksylsyreklorid-hydroklorid (2) foregår analogt syntesen av (6). Utbyttene av de enkelte syntesetrinnene, samt den spektroskopiske karakteriseringen, er angitt nedenfor.

15

N-(4-metoksyfenyl)-N-[4-(4-benzyloksykarbonylbutyl)-benzensulfonyl]-akridin-9-karboksylsyreamid (8)

Utbytte: 40% seig olje, størkner delvis.

NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ = 2,85 (m, 4H), δ = 2,45 ppm (t, br, 2H), δ = 2,8 ppm (t, br, 2H), δ = 3,5 ppm (s, 3H), δ = 5,15 ppm (s, 2H), δ = 6,3 ppm (d, 2H), δ = 6,9 ppm (d, 2H), δ = 7,3-8,3 ppm (m, 17H).

N-(4-metoksyfenyl)-N-[4-(4-karboksybutyl)benzensulfonyl]-akridin-9-karboksylsyreamid-hydrobromid (9)

Utbytte: 95%. Smeltepunkt: dekomponering 153-5°C.

NMR (DMSO , 100 MHz): δ = 1,7 ppm (s, br, 4H), δ = 2,3 ppm (t, br, 2H), δ = 2,8 ppm (s, br, 2H), δ = 3,5 ppm (s, br, 3H), δ = 6,5 ppm (br, 2H), δ = 7,05 ppm (br, 2H), δ = 7,5-8,5 ppm (m, 12H).

N-(4-metoksyfenyl)-N-[4-(4-suksinimidoyloksykarbonylbutyl)-benzensulfonyl]akridin-9-karboksylsyreamid (10)

Utbytte: 25%. Smeltepunkt: dekomponering 75-80°C.

NMR (DMSO, 100 MHz): δ = 1,8 ppm (br, 4H), δ = 2,3 ppm (s, 2H), δ = 2,85 ppm (s, br, 6H), δ = 3,5 ppm (s, br, 3H), δ = 6,5 ppm (d, br, 2H), δ = 7,05 ppm (d, br, 2H), δ = 7,5-8,3 ppm (m, 12H).

5

N-(4-metoksyfenyl)-N-[4-(4-suksinimidoyloksykarbonylbutyl)-benzensulfonyl]-10-metylakridinium-9-karboksylysyreamid-fluorsulfonat (11)

10 Utbytte: 90%.

NMR (DMSO, 100 MHz): δ = 1,8 ppm (br, 4H), δ = 2,3 ppm (s, br, 2H), δ = 2,8 ppm (s, br, 6H), δ = 3,5 ppm (s, br, 3H), δ = 4,8 ppm (br, 3H), δ = 6,5 ppm (br, 2H), δ = 7,05 ppm (br, 2H), δ = 7,5-9,0 ppm (m, 12H).

15 IR: 3340 cm^{-1} (br), 3060 (w), 2930 (m), 2870 (w), 1810 (w), 1785 (w), 1740 (s), 1695 (m), 1600 (w), 1550 (w), 1510 (m), 1460 (w), 1370 (m), 1290 (s), 1250 (s), 1205 (s), 1170 (s).

Massespektrum: m/z = 680 M^+ (kation).

20 **Eksempel 3:**

Fremstillingen av N-(2,4-dimetoksyfenyl)-N-[4-(2-suksinimidoyloksykarbonyletyl)benzensulfonyl]-10-metyl-akridinium-9-karboksylysyreamid-fluorsulfonat (16a) med utgangspunkt i 4'-[N-(2,4-dimetoksyfenyl)-sulfamido]-3-fenylpropionsyrebenzylester (12a) og akridin-9-karboksylysyreklorid-hydroklorid (2) foregår analogt syntesen av (6). Utbyttene i de enkelte syntesetrinnene, samt den spektroskopiske karakteriseringen av angitt nedenfor.

30 N-(2,4-dimetoksyfenyl)-N-[4-(2-benzyloksykarbonyletyl)-benzensulfonyl]akridin-9-karboksylysyreamid (13a)

Utbytte: 50% Smeltepunkt: 74°C

35 NMR (DMSO, 100 MHz): δ = 2,9 ppm (d, br, 2H), δ = 3,1 ppm (d, br, 2H), δ = 3,3 ppm (s, 3H), δ = 3,4 ppm (s, 3H), δ = 5,1 ppm (s, 2H), δ = 5,9-6,2 ppm (m, 2H), δ = 7,0 ppm (d, 1H), δ = 7,35 ppm (s, 5H), δ = 7,5-8,2 ppm (m, 12H).

N-(2,4-dimetoksyfenyl)-N-(2-karboksyetyl)benzensulfonyl]-akridin-9-karboksylysyreamid-hydrobromid (14a)

5 Utbytte: 95%

NMR (DMSO, 100 MHz): δ = 2,75 ppm (d, br, 2H), δ = 3,05 ppm (d, br, 2H), δ = 3,3 ppm (s, 3H), δ = 3,5 ppm (s, 3H), δ = 5,95-6,3 ppm (m, 2H), δ = 7,05 ppm (d, 1H), δ = 7,6-8,6 ppm (m, 12H), δ = 9,2 ppm (s, br, 2H).

10

N-(2,4-dimetoksyfenyl)-N-[4-(suksinimidoyloksykarbonyletyl)-benzensulfonyl]akridin-9-karboksylysyreamid (15a)

Utbytte: 45% Smeltepunkt: ~ 105°C, dekomponering

15

NMR (DMSO, 100 MHz): δ = 2,9 ppm (s, 4H), δ = 3 ppm (br, 2H), δ = 3,2 ppm (s, 3H), δ = 3,4 ppm (s, 3H), δ = 5,9-6,3 ppm (m, 2H), δ = 7,0 ppm (d, 1H), δ = 7,5-8,4 ppm (m, 12H)

20

IR (KBr-preset prøve): 3440 cm^{-1} (br), 3060 (w), 2930 (w), 2850 (w), 1815 (w), 1785 (w), 1740 (s), 1695 (m), 1600 (w), 1510 (m), 1460 (w), 1440 (w), 1365 (m), 1320 (w), 1290 (w), 1240 (m), 1210 (s), 1165 (m), 1085 (m).

25

N-(2,4-dimetoksyfenyl)-N-[4-(2-suksinimidoyloksykarbonyletyl)-benzensulfonyl]-10-metylakridinium-9-karboksylysyreamid-fluorsulfonat (16a)

Utbytte: 80% Smeltepunkt: ~ 135°C, dekomponering

30

NMR (DMSO, 100 MHz): δ = 2,9 ppm (s, 4H), δ = 2,95-4,2 ppm (m, 10H), δ = 4,8-5,0 ppm (s, s, 3H), δ = 6,05-6,25 ppm (m, 1H), δ = 7,6-9,0 ppm (m, 14H).

IR (KBr-preset prøve). 3430 cm^{-1} (m), 1950 (w), 2870 (w), 2825 (w), 1810 (w), 1780 (m), 1750 (s), 1695 (m), 1610 (m), 1555 (w), 1510 (m), 1465 (m), 1380 (m), 1285 (m), 1250 (m), 1210 (s), 1170 (m).

35

Eksempel 4:

Syntesen av N-(3,4-etylendioksyfenyl)-N-[4-(2-suksinimidoyl-
oksykarbonyletyl)benzensulfonyl]-10-metylakridinium-9-
karboksylsyreamid-fluorsulfonat (16b) med utgangspunkt fra
5 4'-[N-(3,4-etylendioksyfenyl)sulfamido]-3-fenylpropion-
syrebenzylester (12b) og akridin-9-karboksylsyrekloridhydro-
klorid (2) foregår analogt eksempel 1. Utbyttene i de
enkelte trinnene, samt den spektroskopiske karakteriseringen
er angitt nedenfor.

10 N-(3,4-etylendioksyfenyl)-N-[4-(2-benzyloksykarbonyletyl)-
benzensulfonyl]akridin-9-karboksylsyreamid (13b)

Utbytte: 50% Smeltepunkt: 91,5°C

15 NMR (DMSO, 100 MHz): δ = 2,9 ppm (d, br, 2H), δ = 3,1 ppm
(d, br, 2H), δ = 4,0 ppm (s, br, 4H), δ = 5,1 ppm (s, 2H), δ
= 6,3-6,8 ppm (m, 3H), δ = 7,3 ppm (s, 5H), δ = 7,6-8,3 ppm
(m, 12H).

20 N-(3,4-etylendioksyfenyl)-N-[4-(2-karbonyloksyetyl)-benzen-
sulfonyl]akridin-9-karboksylsyreamid-hydrobromid (14b)

Utbytte: 95% Smeltepunkt: > 200°C

25 NMR (DMSO, 100 MHz): δ = 2,7 ppm (m, 2H), δ = 3,05 ppm (m,
2H), δ = 4,0 ppm (s, br, 4H), δ = 6,3-6,8 ppm (m, 3H), δ =
7,5-8,6 ppm (m, 12H), δ = 9,6 ppm (s, br, 2H).

N-(3,4-etylendioksyfenyl)-N-[4-(suksinimidoyloksykarbonyl-
etyl)benzensulfonyl]akridin-9-karboksylsyreamid (15b)

30 Utbytte: 45% Smeltepunkt: 140°C, dekomponering

NMR (DMSO, 100 MHz): δ = 2,7-2,9 ppm (d, s, overlagret, 6H),
 δ = 3,0 ppm (d, 2H), δ = 4,0 ppm (s, br, 4H), δ = 6,3-6,8 ppm
(m, 3H), δ = 7,5-8,4 (m, 12H).

35 IR (KBr-preset prøve): 3420 cm^{-1} (br), 3060 (m), 2980 (m),
1930 (m), 1810 (w), 1790 (w), 1740 (m), 1695 (s), 1590 (m),

1460 (w), 1430 (w), 1410 (w), 1370 (m), 1300 (m), 1225 (s), 1175 (s).

5 N-(3,4-etylendioksyfenyl)-N-[4-(suksinimidoyloksykarbonyl-etyl)benzensulfonyl]-10-metylakridinium-9-karboksylysyreamid-fluorsulfonat (16b)

Utbytte: 80% Smeltepunkt: ~ 110°C, dekomponering
10 NMR (DMSO, 100 MHz): δ = 1,85 ppm (s, 4H), δ = 3,0-3,3 ppm (s, s, br, 4H), δ = 3,8-4,5 ppm (m, br, 4H), δ = 4,75-5,1 ppm (s, br med skuldre, 3H), δ = 6,3-9,0 ppm (m, 15H).

Eksempel 5:

15 N-(4-karboksyfenyl)-4-toluensulfonsyreamid

Til en blanding av 252 g (3 mol) natriumhydrogenkarbonat og 139,1 g (1 mol) 4-aminobenzosyre i 2,5 l vann tilsettes det dråpevis ved 20-30°C en oppløsning av 190,5 (1 mol) 4-toluensulfoklorid i 300 ml i-propyleter. Det omrøres kraftig
20 i 2-4 timer inntil sulfokloridet er forbrukt. Den fraskilte vandige oppløsningen innstilles med konsentrert saltsyre på pH 1 og det utfelte produktet opptas i propylacetat. Ekstraktet vaskes 2 ganger med 2 N-saltsyre, 1 gang med vann, det tørkes over natriumsulfat og inndampes. Det oppnås 240
25 g/82,5% av teoretisk) N-(4-karboksyfenyl)-4-toluensulfonsyreamid.

1H-NMR (DMSO d_6): δ = 2,3 (s, CH₃); 7,1 (d, aromat., 2H), 7,3 (d, aromat., 2H); 7,6-7,9 (m, aromat., 4H); 10,75 (bred);
30 12,7 (bred).

N-(4-benzyloksykarbonylfenyl)-4-toluensulfonsyreamid
En oppløsning av 11,64 g (40 mMol) N-(4-karboksyfenyl)-4-toluensulfonsyreamid, 5,06 g (40 mMol) benzyklorid, 5,20 g
35 (44 mMol) di-i-propyl-etylamin i 100 ml dimetylformamid oppvarmes i 4 timer til 140°C. Etter avsluttet reaksjon inndampes i vakuum, det opptas i propylacetat, vaskes 2

ganger med 2 N saltsyre, 2 ganger med mettet NaHCO_3 -oppløsning, det tørkes over natriumsulfat og inndampes. Det oppnås 11,8 g (78% av teoretisk) N-(4-benzyloksykarbonylfenyl)-4-toluensulfonsyreamid, som omkrystalliseres fra metanol.

5

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO } d_6$): $\delta = 2,3$ (s, CH_3); 5,3 (s, CH_2); 7,1-7,3 (dd, 4 aromat., H); 7,4 (s, C_6H_5); 7,7-7,9 (dd, 4 aromat., H); 10,8 (bred, NH).

10 N-(4-benzyloksykarbonylfenyl)-N-(4-toluensulfonyl)-akridin-9-karboksylsyreamid

Til oppløsningen av 1,5 g (4 mMol) N-(4-benzyloksykarbonylfenyl)-4-toluensulfonsyreamid, 1,23 g (4,4 mMol) akridinsyreklorid-hydroklorid og 0,02 g dimetylaminopyridin i 20 ml vannfri tetrahydrofuran tilsettes det ved 25°C dråpevis 2,1 ml (15 mMol) trietylamin i 10 ml tetrahydrofuran. Temperaturen økes til 60°C .

20 Det utkrystalliserte produktet utrøres etter avsluttet reaksjon med metanol og omkrystalliseres fra etylacetat.

Utbytte: 1,57 g (67,0% av teoretisk)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 2,5$ (s, CH_3); 5,2 (s, CH_2); 7,3 (s, C_6H_5); 7,0-8,2 (m, 16 aromat., H).

25

N-(4-karboksyfenyl)-N-(4-toluensulfonyl)-akridin-9-karboksylsyreamid-hydrobromid

1,17 g (2 mMol) N-(4-benzyloksykarbonylfenyl)-N-(4-toluensulfonyl)-akridin-9-karboksylsyreamid oppvarmes med 10 ml 33% bromhydrogenid-iseddikoppløsning under omrøring i 4 timer til 60°C . Etter avkjøling suges bunnfallet av og tørkes i vakuum. Utbytte: 1,00 g (87% av teoretisk).

35 $^1\text{H-NMR}$ (TFA): $\delta = 2,6$ (s, CH_3), 7,3-8,6 (m, 16 aromat., H); 11,65 (s, NH); MS: 496 (M^+).

N-(4-suksinimidoyloksykarbonylfenyl)-N-(4-toluensulfonyl)-akridin-9-karboksylysyreamid

Til en oppløsning av 0,57 g (1 mMol) N-(4-karboksyfenyl)-N-(4-toluensulfonyl)-akridin-9-karboksylysyreamid-hydrobromid og
5 0,21 g (2 mMol) trietylamin i 25 ml vannfri tetrahydrofuran tilsettes det under omrøring ved -15°C 0,11 g (1 mMol) klormauksyreetyler. Det omrøres i 1 time ved samme temperatur og tilsettes deretter 0,12 g (1 mMol) N-hydrokysuksinimid. Etter ytterligere 1 time får blandingen stå ved
10 romtemperatur i 15 timer. Det inndampes i vakuum, opptas i etylacetat, utvaskes med vann, natriumhydrogenkarbonatoppløsning og vann og tørkes over natriumsulfat. Etter inndamping oppnår man 0,42 g (70,8% av teoretisk) av det ønskede produktet.

15

$^1\text{H-NMR}$ (TFA): δ = 2,6 (s, CH_3), 3,1 (s, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$), 7,0-8,6 (m, 16 aromat., H).

N-4-suksinimidoyloksykarbonylfenyl)-N-(4-toluensulfonyl)-10-metylakridinium-9-karboksylysyreamid-fluorsulfonat.

20

Til en oppløsning av 0,59 g (1 mMol) N-4-suksinimidoyloksykarbonylfenyl)-N-(4-toluensulfonyl)-akridin-9-karboksylysyreamid i 30 ml 1,2-dikloretan tilsettes det under omrøring ved 25°C 0,85 g (7,5 mMol) fluorsulfonsyreetyler. Reaksjonsproduktet utfelles i løpet av 4 timer. Etter
25 frasuging og tørking oppnår man 0,43 g (60,8% av teoretisk) av det ønskede produktet.

$^1\text{H-NMR}$ (TFA): δ = 2,6 (s, Ar- CH_3), 3,1 (s, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$), 4,9 (s, N- CH_3), 7,3-8,8 (m, 16 arom., H).

30

Eksempel 6:

På samme måte som i eksempel 5 oppnår man fra

N-(4-karboksymetylfenyl)-4-toluen-sulfonsyreamid,

35 N-(4-suksinimidoyloksykarbonylmetylfenyl)-N-(4-toluensulfonyl)-10-metylakridinium-9-karboksylysyreamid-fluorsulfonat.

N-(4-karboksymetylfenyl)-4-toluensulfonsyreamid

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO): δ = 2,3 (s, CH_3), 3,5 (s, CH_2), 7,0 (AB, C_5H_4), 7,3-7,6 (AB, C_6H_4), 10,2 (s, NH).

5 N-(4-benzyloksykarbonylmetylfenyl)-4-toluensulfonsyreamid

Utbytte: 35% av teoretisk.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO): δ = 2,3 (s, CH_3), 3,6 (s, COCH_2), 5,1 (s, OCH_2), 6,9-7,7 (m, 13 aromat., H), 10,2 (s, NH).

10

N-(4-benzyloksykarbonylmetylfenyl)-N-(4-toluensulfonyl)-akridin-9-karboksylsyreamid

Utbytte: 35% av teoretisk.

15 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 2,55 (s, CH_3), 3,3 (s, COCH_2), 5,0 (s, O-CH_2), 6,7-8,2 (m, 21 aromat., H).

N-(4-karboksymetylfenyl)-N-(4-toluensulfonyl)-akridin-9-karboksylsyreamid-hydrobromid

20 Utbytte: 95% av teoretisk.

$^1\text{H-NMR}$ (TFA): δ = 2,65 (s, CH_3), 3,55 (s, CH_2), 6,8-8,6 (m, 16 aromat., H).

25 N-(4-suksinimidoyloksykarbonylmetylfenyl)-N-(4-toluensulfonyl)-akridin-9-karboksylsyreamid

Utbytte: 71% av teoretisk.

30 $^1\text{H-NMR}$ (TFA): δ = 2,65 (s, toluen- CH_3), 3,0 (s, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$), 3,6 (bred, COCH_2), 6,9-8,5 (m, aromat).

N-(4-suksinimidoyloksykarbonylmetylfenyl)-N-(4-toluensulfonyl)-10-metylakridinium-9-karboksylsyreamid-fluorsulfonat

Utbytte: 80% av teoretisk.

35

$^1\text{H-NMR}$ (TFA): δ = 2,6 (s, toluen- CH_3), 2,9 (s, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$), 3,6 (bred, COCH_2), 4,9 (s, N- CH_3), 6,8-8,9 (m, aromat).

Eksempel 7

På samme måte som i eksempel 5 får man fra

N-[4-(2-karboksyetyl)-fenyl]-4-toluensulfonsyreamid,

5 N-[4-(2-suksinimidoyloksykarbonyletyl)-fenyl]-N-(4-toluensulfonyl)-10-metyl-akridinium-9-karboksylysyreamid-fluorsulfonat.

N-[4-(2-karboksyetyl)-fenyl]-4-toluensulfonsyreamid

Utbytte: 44% av teoretisk.

10

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO): $\delta = 2,3$ (s, CH_3), 2,4-2,8 (m, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$), 7,0 (AB, 4H), 7,2-7,8 (AB, 4H), 10,1 (s, NH).

N-[4-(2-benzyloksykarbonyletyl)-fenyl]-4-toluensulfonsyreamid

15 Utbytte: 78% av teoretisk.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 2,35$ (s, CH_3), 2,4-3,0 (m, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$), 5,1 (s, O-CH_2), 7,0-7,8 (13 aromat., H, NH).

20 N-[4-(2-benzyloksykarbonyletyl)-fenyl]-N-(4-toluensulfonyl)-akridin-9-karboksylysyreamid

Utbytte: 77% av teoretisk.

25 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 2,2\text{-}2,8$ (m, 7H); 5,0 (s, CH_2), 6,65-7,0 (AB, 4 aromat., H), 7,3-8,3 (m, 17 aromat., H).

N-[4-(2-karboksyetyl)-fenyl]-N-(4-toluensulfonyl)-akridin-9-karboksylysyreamid-hydrobromid

Utbytte: 65% av teoretisk.

30

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD): $\delta = 2,1\text{-}2,8$ (m, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$), 2,5 (s, CH_3), 6,7-8,5 (16 aromat., H).

35 N-(4-(2-suksinimidoyloksykarbonyletyl)-fenyl)-N-(4-toluensulfonyl)-akridin-9-karboksylysyreamid

Utbytte: 90% av teoretisk.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 2,6$ (s, CH_3), $2,7$ (bred, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$), $2,8$ (s, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$), $6,6\text{-}8,3$ (16 aromat., H).

N-[4-(2-suksinimidoyloksykarbonyletyl)-fenyl]-N-(4-toluensulfonyl)-10-metyl-akridinium-9-karboksylysyreamid-fluorsulfonat
 5 Utbytte: 84% av teoretisk.

$^1\text{H-NMR}$ (TFA): $\delta = 2,6$ (s, CH_3), $2,3\text{-}3,3$ (bred bakgrunn, 11H, s, 3, 1), $4,9$ (s, N- CH_3), $6,7\text{-}8,8$ (16 aromat., H).

10

Eksempel 7a:

På tilsvarende måte som i de foregående eksemplene oppnår man N-[4-(N-metylmorfolino-N-2-etoksy)-fenyl]-N-[4-(2-suksinimidoyl-karboksyetyl)-fenylsulfonyl]-10-metylakridin-9-karboksylysyreamid-dilium-di-fluorsulfonat. Avvikende fremgangsmåte-
 15 trinn er angitt i de følgende reaksjonstrinnene.

(4-klorsulfonyl)-2-fenylpropionsyre-tert.butylester
 25 g (0,1 mol) (4-klorsulfonyl)-2-fenylpropionsyre, 12 ml
 20 tert.butanol, 60 ml i-buten og 3 ml konsentrert svovelsyre
 blandes ved -15°C og omrøres intenst i en autoklav ved
 romtemperatur i 24 timer. Den på nytt til -15°C avkjølte
 reaksjonsblandingen innrøres i overskudd natriumhydrogenkar-
 bonatopløsning, ekstraheres med metylenklorid og inndampes
 25 til sist under vakuum.

Utbytte: 20,4 g (67% av teoretisk). Produktet omkrystal-
 liseres fra heksan.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 1,4$ (s), $2,6$ (m), $3,0$ (t), $7,4$ (m), $7,95$ (m).

30

MS: $\frac{m}{2} = 305$ (M^+H).

(4-klorsulfonyl)-2-fenylpropionsyre ble fremstilt på kjent
 måte fra 2-fenylpropionsyre og klorsulfonsyre.

35

4-(morfolino-N-2-etoksy)anilin

25 g (0,1 M) 4-(morfolino-N-2-etoksy)-nitrobenzen kokes med 75 g tinngranulat i 400 ml halvkonsentrert saltsyre i 4 timer under tilbakeløp. Etter avkjøling helles i 400 ml 33% saltsyre, ekstraheres med i-propyleter og den organiske fasen inndampes etter tørking. Det oppnås 20 g (90% av teoretisk) av det ønskede produktet.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 2,5$ (t), 2,7 (t), 3,5 (bred), 3,7 (t), 4,0 (t), 6,6 (m)

MS: $\frac{m}{2} = 222$ (M^+)

Det samme produktet oppnår man ved hydrering av nitroforbindelsen i metanol over palladium-kull.

Nitroforbindelsen ble fremstilt ifølge Bull. Soc. chim. France 1955, 1353-62.

N-[4-(morfolino-N-2-etoksy)-fenyl]-N-[4-(2-t-butoksykarbonyletyl)-fenylsulfonamid]

Den klare oppløsningen av 9,3 g (30 mMol) 4-klorsulfonylfenyl-propionsyre-t-butylester, 6,9 g 4-(morfolino-N-2-etoksy)-anilin og 0,3 g dimetylaminopyridin i 150 ml metylenklorid vaskes etter 10 timers henstand ved romtemperatur med mettet natriumhydrogenkarbonatoppløsning, inndampes til en tredjedel og kromatograferes over en giselsøyle med en blanding av 90% metylenklorid og 10% metanol. Hovedfraksjonen av eluatet inndampes.

Utbytte: 9 g (61,2% av teoretisk)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 1,35$ (s), 2,5 (m), 2,7-3,0 (m), 3,7 (m), 4,0 (t), 6,7-7,0 (m), 7,2-7,7 (m)

MS: $\frac{m}{2} = 491$ (M^+H)

N-[4-(morfolino-N-2-etoksy)-fenyl]-N-[4-(2-t-butoksykarbonyletyl)-fenylsulfonyl]-9-akridinkarboksylsyreamid

En oppløsning av 2,0 g (4,1 mMol) N-[4-(morfolino-N-2-etoksy)-fenyl]-N-[4-(2-t-butoksykarbonyletyl)-fenyl-sulfonamid] i 50 ml metylenklorid blandes under kraftig omrøring trinnvis med 50 ml 33% natronlut, 30 mg dimetylaminopyridin, 1,2 g tetrabutylammoniumklorid og 1,55 g (5,6 mMol) 9-akridinkarboksylsyrekloridhydroklorid. Etter 6 timer fraskilles den organiske fasen, utvaskes med vann, tørkes over natriumsulfat og inndampes.

Utbytte: 2,8 g (98% av teoretisk)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 1,4 (s), 2,3-2,5 (m), 2,5-2,8 (m), 3,0-3,3 (t), 3,6-3,9 (m), 6,3 (d), 6,9 (d), 7,4-8,3 (m).

MS: $\frac{m}{2} = 695$ (M^+)

N-[4-(morfolino-N-2-etoksy)-fenyl]-N-[4-(2-karboksyetyl)-fenylsulfonyl]-9-akridinkarboksylsyreamid

20

0,7 g (1 mMol) N-[4-morfolino-2-etoksy)-fenyl]-N-[4-(2-t-butoksykarbonyletyl)-fenylsulfonyl]-9-akridinkarboksylsyreamid oppløses i 5 ml trifluoreddiksyre og får stå over natten ved romtemperatur. Det inndampes ved hjelp av vannstrålepumpe, oppløses i vann og den filtrerte oppløsningen innstilles med natriumacetat på pH 4. Det dannede produktet ekstraheres med metylenklorid, tørkes over natriumsulfat og inndampes.

25

Utbytte: 0,6 g (94% av teoretisk).

30

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO): δ = 2,6-3,0 (m), 3,0-3,3 (m), 3,6-4,0 (m), 4,0-4,4 (m), 5,8-6,6 (m), 6,8-7,0 (m), 7,3-8,4 (m).

MS: $\frac{m}{2} = 639$ (M^+)

35

N-[4-(morfolino-N-2-etoksy)-fenyl]-N-[4-(2-suksinimidoylkarboksyetyl)-fenylsulfonyl]-9-akridinkarboksylsyreamid

Utbytte: 95% av teoretisk.

5 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 2,3-2,7 (m), 2,8 (s), 2,9-3,4 (m), 3,5-3,9 (m), 3,9-4,3 (m), 6,2-7,0 (m), 7,3-8,3 (m).

MS: 736 (M^+).

10 N-[4-(N-metylmorfolino-N-2-etoksy)-fenyl]-N-[4-(2-suksinimidoyl-karboksyetyl)-fenyl-sulfonyl]-10-metylakridin-9-karboksylsyreamidium-di-fluorsulfonat

Utbytte: 84% av teoretisk.

Forbindelsen er med klar gul farge klart vannoppløslig.

15

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO): δ = 2,85 (s), 3,1 (s), 3,2-4,4 (m), 4,75 (s), 6,4-8,3 (m).

Eksempel 8

20 Tracer-fremstilling for TSH-kjemiluminiscens-immunoanalysen.

91 μl antistoff (100 μg), 20 μl av det ifølge eksempel 1 fremstilte akridiniumderivatet (forbindelse (6)) (1 mg/ml i acetonitril og 600 μl konjugasjonsbuffer (0,01 M fosfat, pH 8,0) inkuberes i 15 minutter. Deretter tilsettes 200 μl -
25 lysin (10 mg/ml i konjugasjonsbuffer) og det inkuberes i ytterligere 15 minutter. Denne blandingen anbringes på en PD 10-søyle ("Sephadex" G 25 Medium, (kuleformig tverrbundet dekstrangel, fa. Pharmacia, Sverige)), og elueres med 0,1 M
30 fosfat, (pH 6,3 som elueringsmiddel). 10 dråper/fraksjon samles. De enkelte fraksjonene undersøkes etter egnet fortynning vedrørende kjemiluminiscensaktiviteten (350 μl oksydasjonsmiddel: 0,1% H_2O_2 i 0,1 N NaOH). Tracerfraksjonen (1. aktivitetstopp) "samles" og lagres ved 4°C. Den
35 bruksferdige traceren for h-TSH-kjemiluminiscens-immunoanalysen fremstilles ved egnet fortynning med en fosfatbuffer (0,1 M fosfat, pH 6,3, 1% "Tween 20" (polyetylenorbitanmonolau-

rat, fa. f.eks. ICI American Inc., USA), 0,1% okseserumalbumin, 0,1 M NaCl, 0,01% NaN₃).

Eksempel 9

5 Gjennomføring av h-TSH-kjemiluminiscens-immunoanalysen.

50 µl standard/prøve og 200 µl tracer ble ristet i 2 timer ved romtemperatur i et rør belagt med monoklonalt anti-TSH-antistoff. Deretter vaskes det 3 ganger med 1 ml buffer, hhv. destillert vann. Lysemissjonen foregår ved tilsats av i 10 et hvert tilfelle 300 µl aktiveringsreagens (pH 1-buffer, 0,5% H₂O₂ og 300 µl startreagens, 0,2 N NaOH) over 2 dispensorer i luminometere inn i røret. Måletiden utgjør 1 sekund.

15

Figur 3 viser det typiske forløpet for en standardkurve for en immuno-kjemiluminometrisk analyse (ICMA) for det humane thyreoid-stimulerende hormonet (h-TSH).

20

25

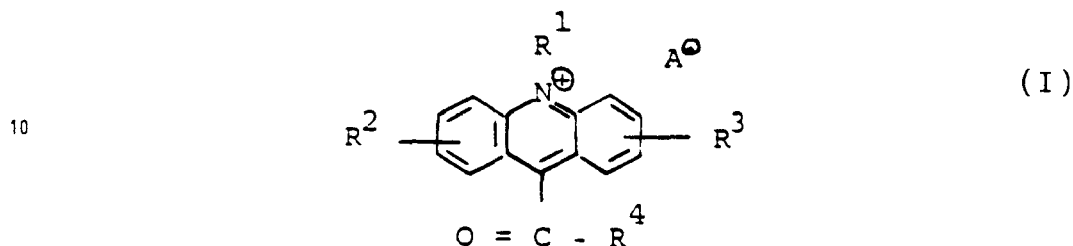
30

35

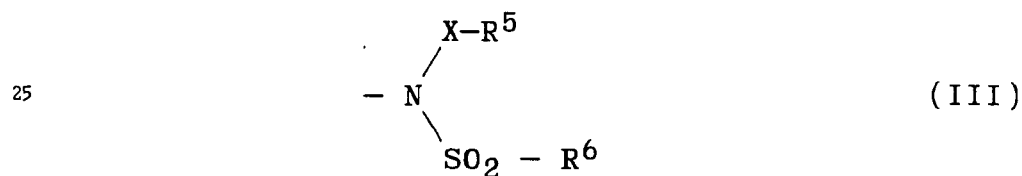
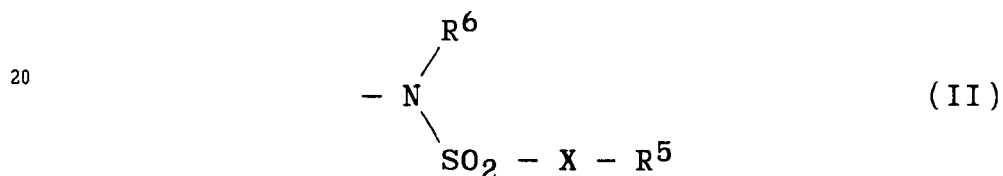
P a t e n t k r a v

1.

Fremgangsmåte for fremstilling av en luminiscent forbindelse,
 5 k a r a k t e r i s e r t v e d a t e t a k r i d i n i u m d e r i v a t
 av formel I



15 hvori R¹ er metyl,
 R² og R³ er hydrogen,
 R⁴ er en rest av formelen II eller III



30 hvori R⁵ er suksinimidoyloksykarbonyl,
 R⁶ er fenyl, mono- eller disubstituert med alkyl eller
 alkoksy med 1 til 4 C-atomer, eller fenyl som inneholder en
 etylendioksysubstituent, eller fenyl som er substituert med
 N-metyl-morfolino-N-2-etoksy,
 X er p-fenylalkylen, hvorved alkylenkjeden inneholder 1-4 C-
 35 atomer, direkte eller via et bromolekyl, bindes til et
 protein, et polypeptid eller til et annet stoff av biologisk
 interesse under dannelse av et stabilt, immunologisk aktivt
 konjugat.

2.

Anvendelse av minst en luminiscent forbindelse oppnådd ifølge krav 1 sammen med minst en immunologisk aktiv komponent
5 immobilisert på en fast fase i en kompetitiv- eller en sandwich-fremgangsmåte for bestemmelse av et antigenisk stoff i en væskeprøve ved luminiscens-immunoanalyse.

3.

10 Anvendelse ifølge krav 2, hvorved man

- a) inkuberer et med et antigen spesifikt reagerende, immobilisert antistoff med en prøve av væsken som skal undersøkes og et konjugat av antigenet og et kjemilumiscerende akridiniumderivat;
- 15 b) skiller prøven og det ikke-bundne, merkede konjugatet fra hverandre;
- c) det bundne, merkede konjugatet bringes suksessivt eller samtidig sammen med en eller flere reagenser som fremkaller en lysemissjon og
- 20 d) mengden av det tilstedeværende antigenet bestemmes fra den målte styrken av lysemissjonen.

4.

Anvendelse ifølge krav 3, hvorved væsken som skal undersøkes
25 skilles fra immobilisert antistoff før tilsatsen av det merkede konjugatet.

5.

Anvendelse ifølge krav 2, hvorved man

- 30 a) inkuberer et med antigenet spesifikt reagerende, immobilisert antistoff med en prøve av væsken som skal undersøkes og et konjugat av et andre, spesifikt reagerende antistoff og et kjemiluminiscerende akridiniumderivat;
- 35 b) skiller prøven og det ikke-bundne, merkede konjugatet fra hverandre;

- c) bringer det bundne, merkede konjugatet, suksessivt eller samtidig, sammen med en eller flere reagenser for å fremkalle en lysemissjon og
- d) bestemmer mengden av det tilstedeværende antigenet fra den målte styrken av lysemissjonen.

6.

Anvendelse ifølge krav 5, hvorved væsken som skal undersøkes skilles fra immobilisert antistoff før tilsatsen av det merkede konjugatet.

7.

Anvendelse ifølge krav 2, hvorved man

- a) inkuberer et med antistoffet spesifikt reagerende, immobilisert antigen med en prøve av væsken som skal undersøkes og en oppløsning av et konjugat av antistoffet og et kjemiluminiserende akridiniumderivat;
- b) skiller prøven og det ikke-bundne, merkede konjugatet fra hverandre;
- c) bringer det bundne, merkede konjugatet, suksessivt eller samtidig, sammen med en eller flere reagenser for å fremkalle en lysemissjon og
- d) bestemmer mengden av det tilstedeværende antigenet fra den målte styrken av lysemissjonen.

8.

Anvendelse ifølge krav 2, hvorved man

- a) inkuberer et med antistoffet spesifikt reagerende, immobilisert antigen med en oppløsning av et konjugat av antistoffet og et kjemiluminiserende akridiniumderivat;
- b) fraskiller det uomsatte, merkede konjugatet;
- c) tilsetter en prøve av væsken som skal undersøkes;
- d) fraskiller prøven igjen;
- e) bringer det bundne, merkede konjugatet, suksessivt eller samtidig, sammen med en eller flere reagenser for å fremkalle en lysemissjon og

- f) bestemmer mengden av det tilstedeværende antigenet fra den målte styrken av lysemissjonen.

9.

5 Anvendelse ifølge krav 2, hvorved man

- a) inkuberer et med antistoffet spesifikt reagerende, immobilisert antigen med en oppløsning av et konjugat av antistoffet og et kjemiluminiserende akridiniumderivat;
- b) tilsetter en prøve av væsken som skal undersøkes;
- 10 c) fraskiller prøven og det ikke-bundne konjugatet;
- d) bringer det bundne, merkede konjugatet suksessivt eller samtidig, sammen med en eller flere reagenser for å fremkalle en lysemissjon og
- e) bestemmer mengden av det tilstedeværende antigenet fra
15 styrken av lysemissjonen.

20

25

30

35

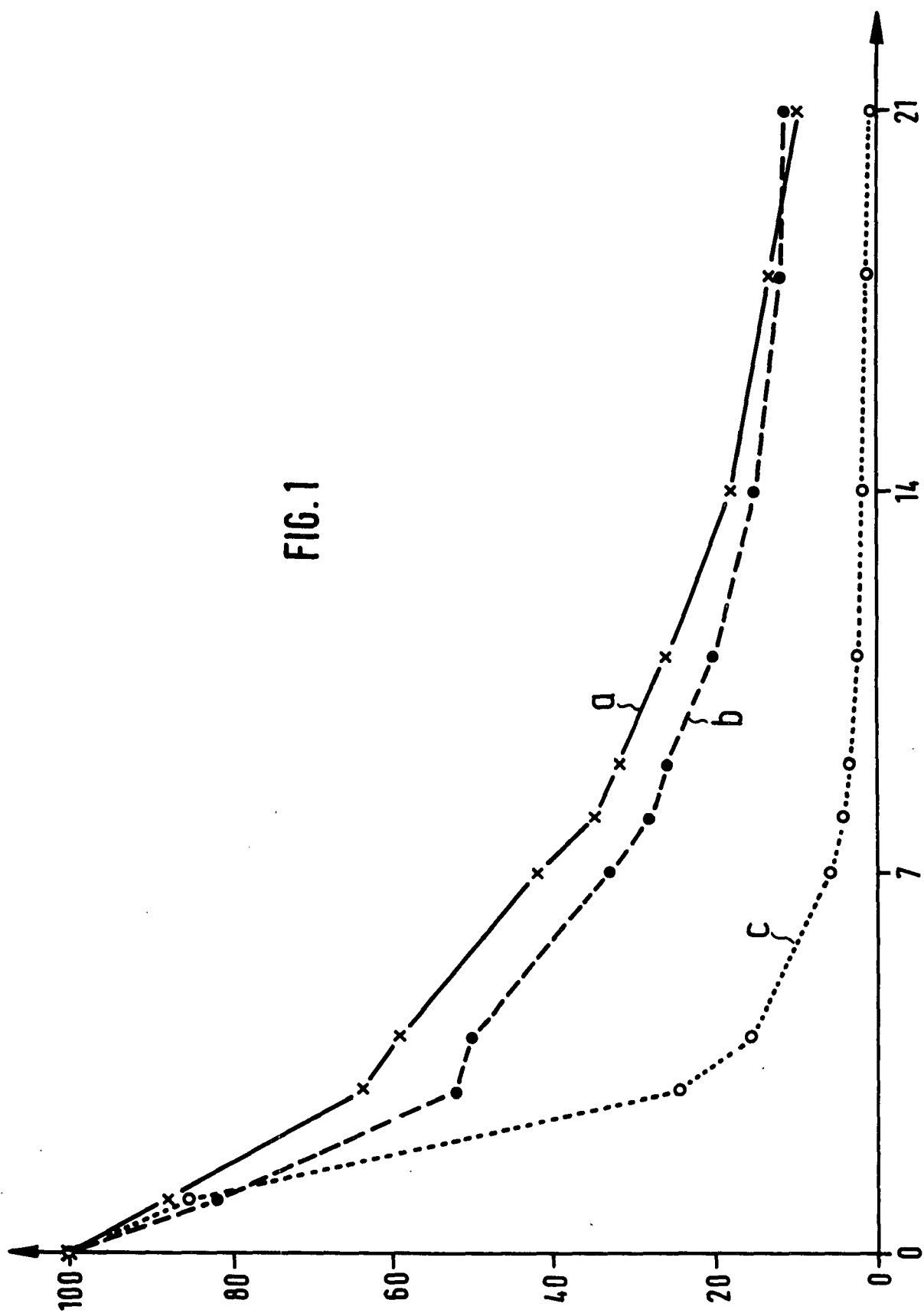


FIG. 2

