

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) N° de publication :

(A n'utiliser que pour les
commandes de reproduction).

2 527 211

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

N° 83 08412

(54) Nouveaux sels de théophylline 8-substituée utiles comme réactifs dans un dosage immunologique avec inhibiteur enzymatique compétitif irréversible.

(51) Classification internationale (Int. Cl. 3). C 07 F 9/32; G 01 N 33/54.

(22) Date de dépôt..... 20 mai 1983.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée : US, 24 mai 1982, n° 380,981.

(41) Date de la mise à la disposition du
public de la demande B.O.P.I. — « Listes » n° 47 du 25-11-1983.

(71) Déposant : Société dite : ABBOTT LABORATORIES. — US.

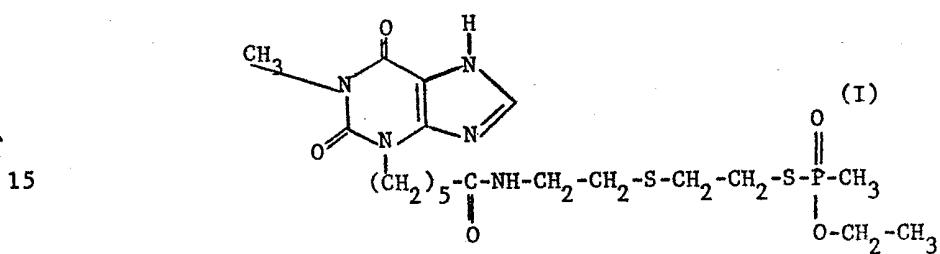
(72) Invention de : Curtis Lee Kirkemo et Charles Arthur Flentge.

(73) Titulaire :

(74) Mandataire : Cabinet Beau de Loménié,
55, rue d'Amsterdam, 75008 Paris.

La présente invention concerne de nouveaux sels de théophylline 8-substituée utiles comme réactifs dans un dosage immunologique de la théophylline avec inhibiteur enzymatique compétitif irréversible.

5 Le brevet des Etats-Unis d'Amérique n° 4 273 866 décrit un dosage immunologique avec inhibiteur enzymatique compétitif irréversible et divers conjugués ligand-inhibiteur enzymatique compétitif irréversible, en particulier le N-(éthoxyméthylphosphinylthio-2 éthyl) [méthyl-1 dioxo-2,6 tétrahydro-1,2,3,6-7H-purine]-3-hexanamide de formule

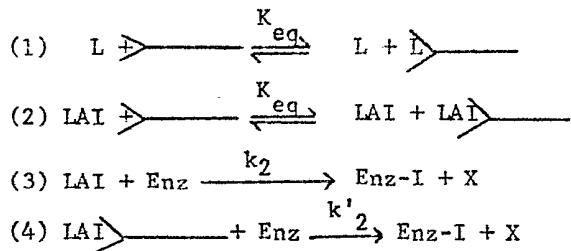


utile comme réactif dans la détermination de la théophylline.

Un dosage immunologique avec inhibiteur enzymatique compétitif irréversible pour la détermination d'un ligand dans un échantillon, consiste à mélanger, avec l'échantillon contenant le ligand à déterminer, un conjugué ligand-inhibiteur enzymatique compétitif irréversible et une protéine fixatrice fixable au ligand et au conjugué ligand-inhibiteur enzymatique compétitif irréversible. Le conjugué ligand-inhibiteur enzymatique compétitif irréversible et le ligand entrent en compétition vis-à-vis des sites de fixation de la protéine fixante. Donc la quantité de conjugué ligand-inhibiteur enzymatique compétitif irréversible fixée à la protéine fixatrice est en relation avec la quantité de ligand contenue dans l'échantillon. La protéine fixatrice inactive l'inhibiteur enzymatique irréversible lorsqu'elle se fixe au conjugué ligand-inhibiteur enzymatique compétitif irréversible. Lorsqu'on mélange une enzyme au mélange réactionnel, la portion d'inhibiteur enzymatique irréversible du conjugué non fixée par la protéine fixatrice réagit avec l'enzyme pour former des liaisons covalentes, ce qui inactive l'enzyme.

Donc, après l'addition d'un substrat à l'enzyme, on peut suivre la réaction enzyme-substrat qui fournit une indication de la quantité de ligand présente dans l'échantillon.

Le dosage immunologique peut être illustré par le schéma réactionnel suivant :



Comme le montrent les réactions (1) et (2), un ligand (L) et un conjugué ligand-inhibiteur enzymatique compétitif irréversible (LAI) entrent en compétition avec la protéine fixatrice (Enz). La protéine fixatrice fixée au conjugué ligand-inhibiteur enzymatique compétitif irréversible (LAI Enz) inactive l'inhibiteur tandis que le conjugué ligand-inhibiteur enzymatique compétitif irréversible libre est disponible pour inhiber de façon irréversible l'enzyme (Enz). Plus la quantité de ligand présente dans l'échantillon est importante, plus la quantité de conjugué ligand-inhibiteur enzymatique compétitif irréversible fixée à la protéine fixatrice est faible et par conséquent plus l'enzyme est inhibée (Enz-I) par le conjugué ligand-inhibiteur enzymatique compétitif irréversible libre. L'enzyme non inhibée réagit avec un substrat approprié et on suit la réaction enzyme-substrat. Dans la plupart des cas, k'_2 est pratiquement réduit à zéro ; c'est-à-dire que la protéine fixatrice inactive le conjugué ligand-inhibiteur enzymatique compétitif irréversible.

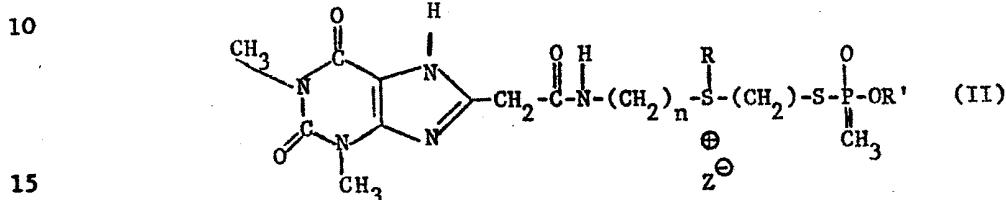
La réaction peut être suivie selon une technique cinétique ou à point final. Ainsi on suit la réaction

$$30 \quad - \frac{d \text{Enz}}{dt} = k_2 [\text{LAI}] [\text{Enz}]$$

selon les techniques cinétiques. Lorsqu'on emploie un excès d'enzyme et qu'on laisse à la réaction le temps de s'achever essentiellement à 99 %, ce système convient bien aux techniques à point final.

Comme illustré par le mécanisme réactionnel ci-dessus, la vitesse d'inhibition de l'enzyme dépend de la constante de vitesse secondaire (k_2). Donc l'accroissement de la valeur de la constante de vitesse secondaire accroît la sensibilité du dosage car on peut 5 réduire la durée du dosage, la quantité des réactifs nécessaires et/ou accroître la dilution de l'échantillon, ce qui diminue notablement les interférences de fond.

L'invention concerne une catégorie de composés de formule :



dans laquelle n est un nombre entier de 2 à 6 ; R et R' sont indépendamment un alkyle en C_1-C_4 ; et Z est un ion complémentaire compatible du point de vue biologique.

20 Les composés de formule (II) sont utiles comme réactifs dans un dosage avec inhibiteur enzymatique compétitif irréversible de la théophylline. Lorsqu'on les emploie dans une telle technique, les composés de formule (II) accroissent la constante de vitesse secondaire et améliorent donc notablement la sensibilité du dosage.

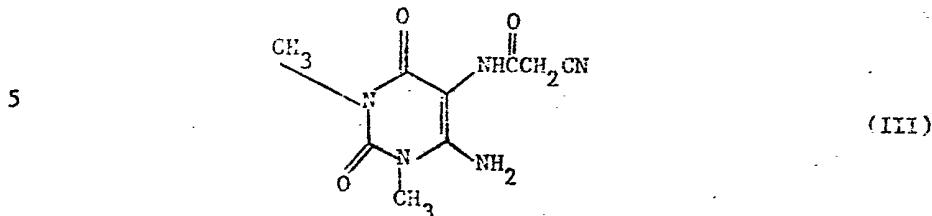
25 L'invention va maintenant être décrite de façon détaillée.

Telle qu'on l'emploie ici, l'expression "ion complémentaire compatible du point de vue biologique", appliquée aux anions représentés par "Z", englobe par exemple les anions chloro, 30 iodo, méthylsulfate, tétrafluoroborate et similaires.

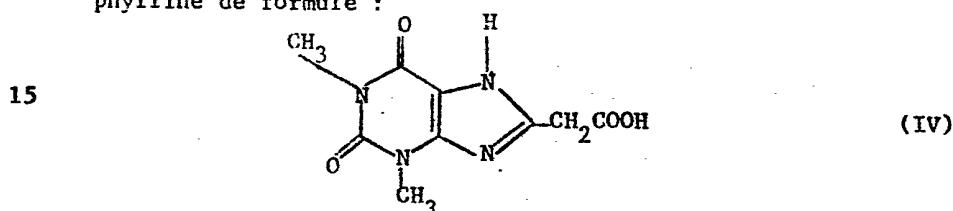
Les radicaux représentés par R et R' comprennent les radicaux alkyles ayant 1 à 4 atomes de carbone, y compris par exemple méthyle, éthyle, propyle, butyle, tert-butyle, et similaires.

On peut préparer les composés de l'invention selon le 35 mode opératoire suivant :

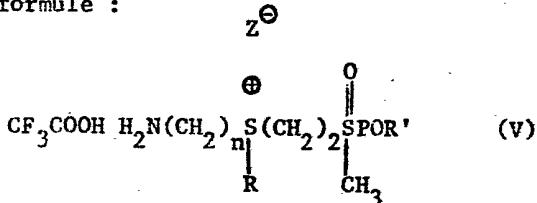
On fait réagir le diamino-5,6 diméthyl-1,3 uracile hydraté avec l'acide cyanoacétique pour obtenir le cyanoacétamido-5 amino-6 diméthyl-1,3 uracile de formule :



10 On traite le cyanoacétamido-5 amino-6 diméthyl-1,3 uracile avec de l'hydroxyde de sodium à une température comprise dans la gamme de 145 à 155°C pour obtenir la carboxyméthyl-8 théophylline de formule :



20 On traite la carboxyméthyl-8 théophylline avec un inhibiteur alkylé de formule :



pour obtenir les composés de formule (II).

25 L'invention sera mieux comprise à la lecture des exemples non limitatifs suivants.:

EXEMPLE I

Préparation de l'inhibiteur alkylé

30 A 25 mg (0,62 mmol) de méthylphosphonothioate d'0-éthyle et de S-(N-tert-butoxycarbonyl amino-9 thia-3 nonyle) dissous dans 3 ml de chlorure de méthylène et refroidi à 0°C, on ajoute 3 ml d'iodométhane puis 134 mg (0,69 mmol) de tétrafluoroborate d'argent. On laisse le mélange réactionnel se réchauffer à la température ordinaire et on l'agit pendant 30 minutes. On filtre le mélange réac-

tionnel et on le concentre sous vide pour obtenir le méthylphosphono-thioate d'0-éthyle et de S-(N-tert-butoxycarbonyl amino-9 méthylthia-3 nonyle) sous forme d'une huile (250 mg ; rendement 80 %).

A 250 mg (0,50 mmol) de méthylphosphonothioate
 5 d'0-éthyle et de S-(N-tert-butoxycarbonyl amino-9 méthylthia-3 nonyle) dissous dans 3 ml de chlorure de méthylène et refroidi à 0°C, on ajoute 1 ml d'acide trifluoroacétique et on agite le mélange réactionnel obtenu à 0°C pendant 45 minutes. On concentre le mélange réactionnel sous vide pour obtenir le trifluoroacétate du méthylphosphonothioate d'0-éthyle et de S-(amino-9 méthylthia-3 nonyle) sous forme d'une huile.

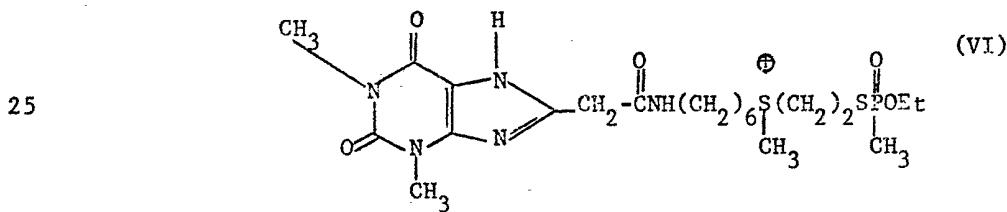
EXEMPLE II

On chauffe à 120-130°C sous atmosphère d'azote un mélange de 19,0 g (0,11 mol) de diamino-5,6 diméthyl-1,3 uracile hydraté et 19,0 g (0,22 mol) d'acide cyanoacétique. Le mélange fond et se resolidifie en 30 minutes. On refroidit à la température ordinaire le résidu resolidifié et on le reprend dans l'acétone. On recueille le résidu sur un filtre, on recristallise dans l'eau en employant du charbon décolorant, on sèche et on triture sous vide pour obtenir 14,2 g (54 %) de cyanoacétamido-5 amino-6 diméthyl-1,3 uracile sous forme d'un solide.

A 140 ml d'hydroxyde de sodium 2N, on ajoute 14,0 g (0,059 mol) de cyanoacétamido-5 amino-6 diméthyl-1,3 uracile et on chauffe le mélange obtenu à 145-155°C jusqu'à ce que la majeure partie de la phase liquide soit éliminée et qu'il demeure un résidu foncé. On refroidit le résidu à la température ordinaire et on ajoute 200 ml d'éthanol absolu. On broie le résidu et on le recueille sur un filtre. On dissout le solide recueilli dans de l'eau. On ajoute goutte à goutte de l'acide chlorhydrique concentré à la solution aqueuse, en agitant jusqu'à ce qu'il se forme un précipité épais. On recueille le précipité sur un filtre, on recristallise dans l'acide chlorhydrique 1 N en employant du charbon décolorant et on sèche sous vide pour obtenir 3,5 g (25 %) de carboxyméthyl-8 théophylline sous forme d'un solide.

35 On dissout 120 mg (0,48 mmol) de carboxyméthyl-8 théophylline dans du diméthylformamide et on refroidit à 0°C. On

ajoute au mélange 106 mg (0,65 mmol) de carbonyl-1,1 imidazole et on agite la réaction pendant 15 minutes à -10°C. On dissout le trifluoroacétate de méthylphosphonothioate d'O-éthyle et de S-(amino-9 méthylthia-3 nonyle) (préparé dans l'exemple I) dans du diméthylformamide et on l'ajoute au mélange réactionnel puis on ajoute 1 à 2 équivalents de triéthylamine jusqu'à ce que le mélange ait un pH de 9. On laisse la réaction se poursuivre pendant 20 minutes puis on verse le mélange réactionnel dans 200 ml d'éther et on maintient à la température ordinaire pendant 10 minutes. On décante l'éther pour obtenir une huile qu'on dissout dans un minimum de méthanol. On ajoute la solution méthanolique à de l'éther, ce qui précipite un produit brut. On centrifuge la solution éthérée contenant le produit brut, on décante et on sèche pour obtenir un produit qu'on purifie par chromatographie avec deux colonnes préparatives de gel de silice EM Lobar RP-8 avec comme éluant un mélange 65/35 d'eau et d'acétone-trifluoroacétique 0,01 M. On reprend dans l'éthanol l'éluat contenant le produit et on précipite avec de l'éther pour obtenir 104 mg (rendement 33 %) de fluoborate de N-[(éthoxyméthylphosphinylthio)-9 méthylsulfonyl-3 nonyl]théophylline acétamide sous forme d'un solide répondant à la formule :



EXEMPLE III

30 On estime comme suit la constante de vitesse d'inhibition de l'acétylcholinestérase par les composés de l'invention.

Réactifs :

Tampon : On prépare toutes les solutions de travail de tous les réactifs dans du tampon phosphate de sodium 0,1 M (pH 7,0) contenant 0,1 % d'α-globuline bovine (phosphate-BGG).

35 Solution de conjugué de ligand-inhibiteur compétitif irréversible :

On prépare une solution de travail $5,0 \times 10^{-6}$ M du composé (VI) dans le tampon phosphate-BGG par dilution d'une solution mère 0,005 M du composé (VI) dans le méthanol.

5 Acétylcholinestérase : on prépare une solution de travail à 0,6 unité d'acétylcholinestérase par ml dans du tampon phosphate-BGG. Une unité d'activité enzymatique est par définition la quantité d'enzyme qui catalyse l'hydrolyse d'une micromole d'acétylcholine par minute à 25°C. Pour une vitesse de turn-over de $5 \times 10^5 \text{ min}^{-1}$, la concentration de l'enzyme dans cette solution est de $1,7 \times 10^{-8}$ M.

10 Substrat : On mesure l'activité enzymatique en employant un tampon phosphate-BGG contenant $7,4 \times 10^{-4}$ M d'iodure d'acétyl β -(méthyl-thio)choline et $2,4 \times 10^{-4}$ M de DTNB.

15 On mesure la pseudo-constante de vitesse de premier ordre pour la réaction d'inhibition par mélange de 25 μ l de la solution de travail de conjugué avec 25 μ l (0,015 unité) de solution d'acétylcholinestérase. On agite la solution pendant 5 minutes puis on l'incube à la température ordinaire. On mesure la quantité 20 d'activité enzymatique résiduelle par addition de 5 μ l de la solution à 0,25 μ l de phosphate-BGG et 0,15 ml de solution de substrat. On mesure la vitesse d'accroissement de l'absorbance avec un Abbott Bichromatic Analyzer (ABA-100) avec un filtre de 415/550 nm. On calcule la constante de vitesse de second ordre (k_2) selon l'équation suivante :

$$25 \quad k_2 = \frac{-\frac{1}{t} \ln \frac{(Adx)}{(Adc)}}{[I]}$$

dans laquelle Adx est la vitesse d'accroissement de l'absorbance en présence du composé (VI) ;

30 Adc est la vitesse d'accroissement de l'absorbance en l'absence du composé (VI) ;

t est l'intervalle d'incubation (minutes) pour l'enzyme et le composé (VI) (c'est-à-dire 5 minutes) ;

et

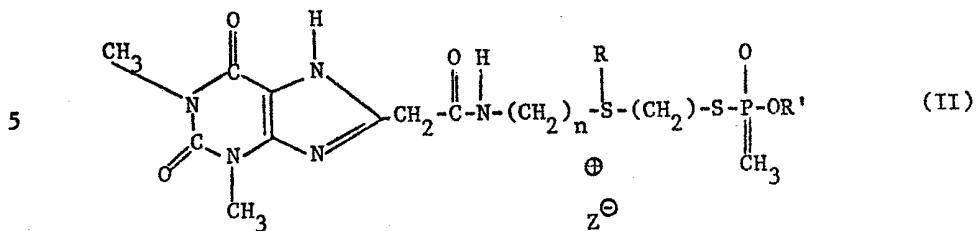
35 [I] est la concentration du composé (VI) (mol/l) de la solution d'incubation enzyme/composé initiale.

La constante de vitesse de second ordre (k_2) obtenue pour le composé de formule (VI) est $3,2 \times 10^8 \text{ l.mol}^{-1} \text{.min}^{-1}$. La valeur de la constante de vitesse de second ordre ainsi obtenue est donc environ 100 fois supérieure à la constante de vitesse de second ordre obtenue à partir du composé de l'art antérieur de formule (I) (k_2 pour le composé de formule (I) est égal à $3 \times 10^{-6} \text{ l.mol}^{-1} \text{.min}^{-1}$). Donc la sensibilité d'un dosage immunologique avec inhibiteur enzymatique compétitif irréversible de la théophylline employant les composés de la présente invention présente un accroissement notable et inattendu.

Bien entendu diverses modifications peuvent être apportées par l'homme de l'art aux dispositifs ou procédés qui viennent d'être décrits uniquement à titre d'exemples non limitatifs sans sortir du cadre de l'invention.

REVENDICATIONS

1. Nouveaux composés caractérisés en ce qu'ils répondent
à la formule :



- 10 dans laquelle n est un nombre entier de 2 à 6 ;
R et R' sont indépendamment un radical alkyle en C₁-C₄ ;
et
Z est un ion complémentaire compatible du point de vue biologique.
2. Composés selon la revendication 1, caractérisés en
15 ce que Z est un ion chlorure, iodure, méthylsulfate ou tétrafluoroborate.
3. Composés selon la revendication 2, caractérisés en
ce que Z est un ion tétrafluoroborate.
4. Composés selon la revendication 1, caractérisés en
20 ce que R est un radical méthyle et R' est un radical éthyle.
5. Composés selon la revendication 4, caractérisés en
ce que Z est un ion tétrafluoroborate.
6. Application des composés selon la revendication 1
comme réactifs dans le dosage immunologique de la théophylline avec
25 inhibiteur enzymatique compétitif irréversible.