



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

212652

(11) (B1)

(51) Int. Cl.³

C 07 D 239/54

(22) Přihlášeno 15 11 79
(21) (PV 7818-79)

(40) Zveřejněno 31 08 81

(45) Vydáno 15 10 84

(75)

Autor vynálezu

LEDVINA MILOŠ doc. MUDr. CSc., PRAHA, RICHTER PETR MUDr., LIBEREC

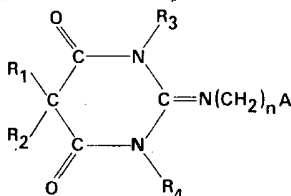
(54) C₂ substituované deriváty barbiturátů

1

Vynález se týká C₂ substituovaných derivátů barbiturátů určených k přípravě specifických imunogenních látek proti barbiturátům a značených haptenů.

Specifická stanovení barbiturátů imunospecifickými metodami závisí hlavně na specifitě použitých protilátek. Všechny dosud popsané metody používaly k imunizaci polosyntetických antigenů, kde byla determinantní skupina barbiturátu připojena na nosič pomocí substituentu na C₅. Takto připojené determinantní skupiny stimulují tvorbu protilátek, které nerozlišují dobře barbituráty s různými C₅ substituenty a nerozlišují také barbituráty a jejich fyziologicky neúčinné metabolity vznikající substitucí na C₅. Dosud známé deriváty barbiturátů nebylo možno připojit pomocí substituentu v poloze C₂ na bílkovinný nosič, nebo jiný nosič používaný v imunologii k stimulaci tvorby protilátek proti nízkomolekulárním látkám. Takové navázání barbiturátu na nosič je nutné pro přípravu antigenu, který stimuluje tvorbu specifických protilátek proti C₅ substituovaným barbiturátům. Dosud známé deriváty barbiturátů nedovolovaly přípravu haptenů značených v poloze C₂, které jsou potřebné pro přípravu isotopicky značených haptenů.

Uvedené nedostatky odstraňuje vynález, jehož podstatou jsou C₂ substituované deriváty barbiturátů k přípravě specifických imunogenních látek proti barbiturátům a značených haptenů. Tyto C₂ substituované deriváty barbiturátů jsou tvořeny látkou obecného vzorce



212652

kde n je 1 až 6

R_1, R_2 značí alkyl s 1 až 6 atomy uhlíku nebo fenyl

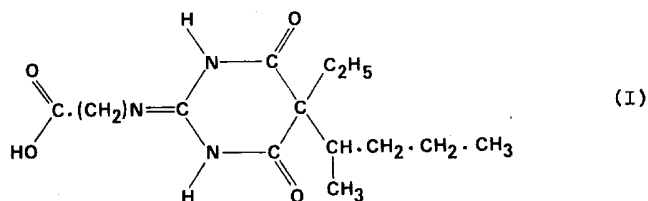
R_3, R_4 značí vodík nebo metyl

A značí skupinu schopnou reakce s postranními řetězci aminokyselin v bílkovinách, zahrnující karboxyl, hydroxyl, aminoskupinu, merkaptoskupinu, imidazolyl, p-hydroxyfenyl, a lze je chemicky připravit, například způsoby podle příkladů.

Vynález blíže objasňují následující konkrétní příklady.

Příklad 1

2-(karboxymethylimino)-5-ethyl-5-(1-methylbutyl)-dihydro-4,6-(1H,5H)-pyrimidindion vzorce I,



byl připraven zahříváním 2,4 g (10 mmol) 5-ethyl-5-(1-methylbutyl)-2-thiobarbiturové kyseliny 1 g glycerinu a 4 ml triethylaminu po dobu 16 hodin při teplotě 85 °C. Potom byl obsah banky odpařen ve vakuu. Syrupovitý odparek byl rozpouštěn v 10 ml vody, jejíž reakce byla upravena hydrokarbonátem sodným na pH 7,6 a roztok byl vytřepán dvakrát 20 ml etheru. Hodnota pH byla upravena na 5,0 kyselinou solnou a roztok byl extrahován dvakrát 30 ml etheru. Etherové extrakty byly spojeny, vytřepány 2 ml vody, vysušeny bezvodým síranem sodným, profiltrovány s malým množstvím aktivního uhlí a odpařeny. Bezbarvý syrupovitý odparek, který byl vysušen nad P_2O_5 , ztuhl v 1,2 g křehkého produktu.

Tento produkt dával při tenkovrstvé chromatografii, nanesen v množství 50 μ g na silufol v rozpouštěcí soustavě butanol:amoniak 8:2 při ozáření UV o vlnové délce 254 jedinou silnou obsahující skvrnu s R_f 0,15.

Detekcí s ninhydrinem se neprokázal glycin, detekcí síranem rtuťnatým a difenylkarbazonem nebyly prokázány barbituráty (pentobarbital, thiopental). Titrační křivka ukazuje na přítomnost jedné karboxylové skupiny v molekule. Zahříváním látky s 1 ml kyseliny solné v zatavené trubici při 120 °C po dobu dvou hodin se látka rozkládá na glycin a pentobarbital.

Látka vzorce I byla použita při přípravě imunogenu. Látka vzorce I byla navázána přes aktivní ester s hydroxysukcinimidem na hovězí albumin. Bylo použito 25násobné molové množství aktivního esteru vůči albuminu, z diferenčního spektra albuminu a konjugátu vzorce I s albuminem byl zjištěn molový poměr navázaných skupin na albumin 5:1. Tento poměr se nezměnil přesrážením imunogenu ethanolem. Imunizace osmi králíků byla provedena injekcemi do tlapek v množství 100 μ g imunogenu na králíka s kompletním Freundovým adjuvans. Po 4 týdnech byla zvířata znovu imunizována 50 μ g imunogenu a za 14 dní byl proveden první odběr. Další odběry byly prováděny u čtyř králíků, kteří měli nejvyšší titry protilátek při prvním odběru, po 4 až 6 týdnech vždy 10 až 14 dní po aplikaci 10 μ g imunogenu.

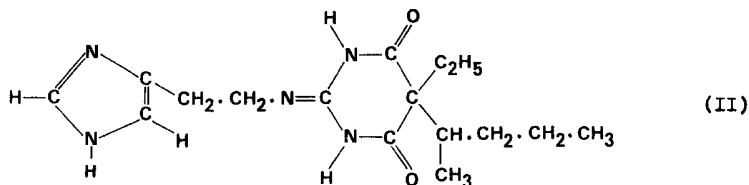
Z methanolového roztoku byl krystalován jako sůl s cyklohexylaminem o t. t. 194 až 195 °C za rozkladu. Elementární analýza ukázala dobrou shodu s navrženou strukturou:

	C	H	N
teorie:	59,66 %	8,96 %	14,65 %
nalezeno:	59,23 %	9,03 %	14,4 %

Sůl s cyklohexylaminem v methanolu má $\epsilon(d = 250 \text{ nm}) = 1,518 \cdot 10^4$, sůl s dicyklohexylaminem má $\epsilon(d = 250 \text{ nm}) = 1,523 \cdot 10^4$.

P ř í k l a d 2

2-(2-imidazolyethylimino)-5-ethyl-5(1-methylbutyl)-dihydro-4,6-(1H,5H)-pyrimidindion
vzorce II



byl připraven zahříváním roztoku jednoho mmolu (0,24 g) thiopentalu, 1 mmolu (0,18 g) histamindihydrochloridu a 0,6 ml triethylaminu v 5 ml ethylenglykolu, po dobu 24 hodin při teplotě 85 °C. Rozpuštědlo bylo odpařeno ve vakuu, odparek rozpuštěn ve 3 ml vody a při pH 3 byl roztok vytřepán dvakrát 10 ml etheru. Potom bylo pH roztoku upraveno na 7,6 hydro-karbonátem sodným a roztok byl extrahován dvakrát 10 ml ethylacetátu. Spojené ethylacetátové extrakty byly extrahovány 2 ml vody, vysušeny bezvodým síranem sodným. Suchý extrakt byl profiltrován po přidání malého množství aktivního uhlí a filtrát odpařen.

Po odpaření bylo získáno 85 mg bílé pevné látky. V soustavě butanol:amoniak 8:2 na Silufolu dávala látka jedinou diazopozitivní skvrnu, absorbující při 254 nm s $R_F = 0,45$. Zahřátím s kyselinou solnou v množství 1 mol/l kyseliny, v zatavené trubici na 120 °C po dobu dvou hodin se látka rozkládá na histamin a pentobarbital. Hmotová spektrometrie je v soulase s předpokládanou strukturou ($M^+ = 319$).

P ř í k l a d 3

2-(2-aminoethylimino)-5-ethyl-5-(methylbutyl)-dihydro-4,6-(1H,5H)-pyrimidindion

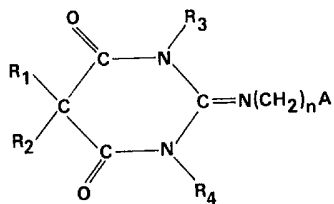
Byl připraven zahříváním 2,4 g thiopentalu s 13 ml 1,2-diaminoethanu (200 mml) při 100 °C po dobu 4 h. Diaminoethan byl potom oddestilován za sníženého tlaku. Sirupovitý zbytek byl třen s malým množstvím bezvodého ethanolu. Přitom se vyloučila bílá sraženina. Nažloutlý alkoholický roztok byl oddělen od sraženiny, odbarven přidavkem aktivního uhlí, profiltrován a odpařen ve vakuu. Odparek sirupovité konsistence byl sušen ve vakuovém exsikátoru nad P_2O_5 . Chromatografie na tenké vrstvě ukazovala v soustavě aceton:chloroform:amoniak 27:3:2 na Silufolu jedinou UV absorbující skvrnu při R_F 0,2.

Amorfní slabě nažloutlá hmota se po vysušení nad P_2O_5 snadno drtila na prášek, který se ale ve styku se vzdušnou vlhkostí měnil na lepivou hmotu. Ve vodném roztoku dávala látka s kyselinou pikrovou žlutou sraženinu. Ta rozpouštěna v alkoholu a přesrážena vodou měla po vysušení nad P_2O_5 teplotu tání 105 °C a prvkové složení odpovídající dipikrátu připravené látky.

	C	H	N
teorie:	41,3 %	4,2 %	19,2 %
nalezeno:	41,15 %	4,7 %	18,94 %

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

C₂ substituované deriváty barbiturátů obecného vzorce



kde

n je 1 až 6

R₁, R₂ značí alkyl s 1 až 6 atomy uhlíku nebo fenyl

R₃, R₄ značí vodík nebo metyl

A značí skupinu schopnou reakce s postranními řetězci aminokyselin v bílkovinách, zahrnující karboxyl, hydroxyl, aminoskupinu, merkaptoskupinu, imidazolyl, p-hydroxyfenyl.