



SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen



F1000092698B

(B) (11) **KUULUTUSJULKAISU
UTLAGGNINGSSKRIFT** 92698

C (15) Patentti myönnetty
Patent beviljad 27.12.1991

(51) Kv.1k.5 - Int.cl.5

C 07D 471/22, 498/22, C 07F 5/00
// (C 07D 471/22, 221:00, 221:00, 259:00, 259:00)
(C 07D 498/22, 221:00, 221:00, 273:00, 273:00)

(21) Patentihakemus - Patentansökning	902981
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	14.06.90
(24) Alkuperäisyys - Löpdag	16.12.88
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	14.06.90
(44) Nähtäväsipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	15.09.94
(86) Kv. hakemus - Int. ansökan	PCT/FR88/00620
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet	
18.12.87 FR 8717765 P	

(71) Hakija - Sökande

1. **Compagnie Oris Industrie SA**, 33, rue de la Fédération, 75015 Paris, France, (FR)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. **Lehn, Jean-Marie**, 21, rue d'Oslo, 67000 Strasbourg, France, (FR)
2. **Mathis, Gérard**, 17, Impasse de la Capelle des Ladres, 30200 Bagnols-sur-Ceze, France, (FR)
3. **Alpha, Béatrice**, 2 Avenue de Beauvert, Appt. 115, 38100 Grenoble, France, (FR)
4. **Deschenaux, Robert**, 15, rue du Chasselas, 2000 Neuchâtel, Switzerland, (CH)
5. **Jolu, Etienne Jean-Pierre**, Les Cyprès - 2 Allée du Romarin, 30200 Bagnols-sur-Ceze, France, (FR)

(74) Asiamies - Ombud: **Oy Kolster Ab**

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Harvinaisten maametallien 2,2-bispyridiylkryptaatteja, menetelmiä niiden valmistamiseksi, niiden synteessin välituotteita ja niiden käyttö fluoresoivina merkkiaineina
2,2-bispyridiylkryptat av sällsynta jordmetaller, förfaranden för deras framställning, mellanprodukter vid deras syntes och deras användning såsom fluorescerande märkämnen

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

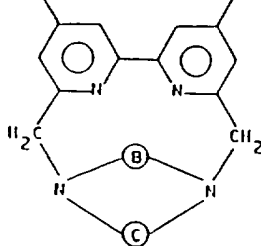
EP B 180492 (C 07D 273/00)

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

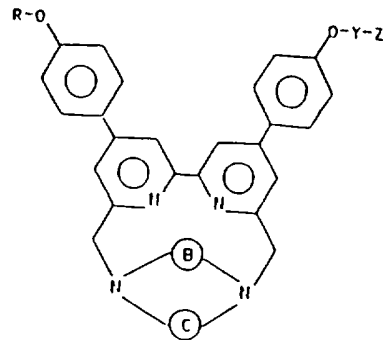
Keksintö koskee harvinaisten maametallien kryptaatteja, jotka koostuvat vähintään yhdestä harvinaisen maametallin suolasta, joka on kompleksoitu kaavan (I) tai (II) mukaiseen makropolysykliseen yhdisteeseen,

Z-Y-NH-OC

CO-NH-Y-Z



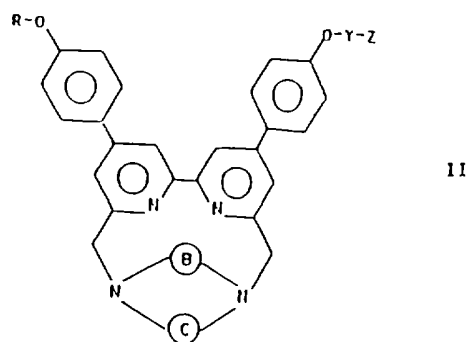
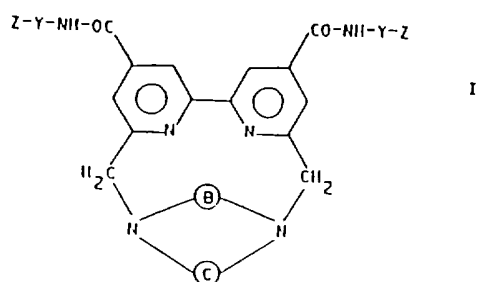
I



II

joissa symboleilla Y, Z, R, B ja C on patenttivaatimuksessa 1 esitetyt merkitykset.

Uppfinningen avser kryptat av sällsynta jordmetaller, vilka består av åtminstone ett sällsynt jordmetallsalt som bildar komplex med en makropolycyklisk förening med någondera formeln

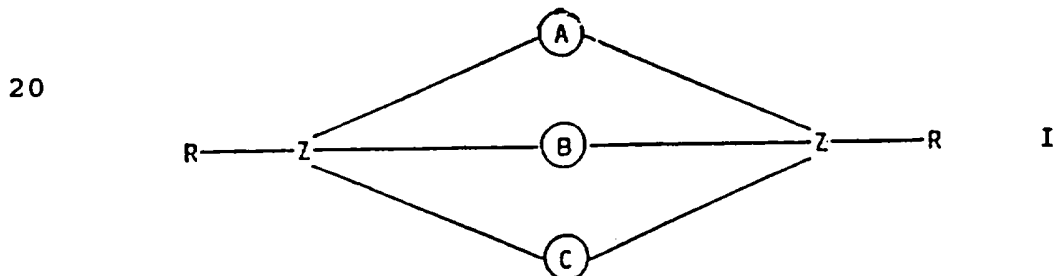


varvid symbolerna Y, Z, R, B och C har de i patentkravet 1 angivna betydelserna.

Harvinaisten maametallien 2,2-bispyridyylikryптаatteja, menetelmiä niiden valmistamiseksi, niiden synteessin väli- tuotteita ja niiden käyttö fluoresoivina merkkiaineina

5 Esillä oleva keksintö, joka on tulosta yhteistyös-
sä professori J.M. Lehnin ja hänen tutkimusryhmänsä kans-
sa Louis Pasteur -yliopistossa Strasbourgissa suoritetus-
ta työstä, koskee fluoresenssin alaa ja tarkemmin ottaen
10 uutta ryhmää harvinaisten maametallien makropolysyklisiä
komplekseja tai harvinaisten maametallien kryптаatteja,
jotka soveltuvat fluoresoiviksi merkeiksi, erityisesti
immunologisiin mittauksiin.

FR-hakemusjulkaisussa 8 414 799 kuvataan harvi-
naisten maametallien makropolysyklisiä komplekseja, jot-
15 ka koostuvat vähintään yhdestä harvinaisen maametallin
suolasta, joka on kompleksoitu makropolysykliseen yhdis-
teeseen, jonka yleinen kaava on



25 jossa Z on 3- tai 4-valenssinen atomi, R puuttuu tai on
vety, hydroksyyli-ryhmä, aminoryhmä tai hiilivetyradikaali,
kaksivalenssiset radikaalit (A), (B) ja (C) ovat toi-
sistaan riippumatta hiilivetyketjuja, jotka sisältävät
mahdollisesti yhden tai useamman heteroatomin ja jotka
30 mahdollisesti katkaisee heteromakrosykli, jolloin vähin-
tään yksi radikaaleista (A), (B) ja (C) käsittää lisäksi
vähintään yhden molekyyllilajin tai se koostuu oleellises-
ti molekyyllilajista, jolla sanotulla molekyyllilajilla on
korkeampi triplettienergia kuin kompleksoidun harvinaisen
35 maametalli-ionin emissiotaso.

Nämä kryptaatit soveltuvat etenkin biologisten yhdisteiden merkeiksi fluoresenssiin perustuvissa immunologisissa toteamis- ja määritysmenetelmissä.

Kun näitä harvinaisten maametallien kryptaatteja
5 käytetään biologisten molekyylien spesifiseksi leimaamiseksi kovalentin sidoksen välityksellä, niiden yksi tai useampi rakennemolekyyllilaji voi olla substituoitu yhdellä tai useammalla riittävän luoksepäästäväällä substituentilla, joka käsittää yhden tai useamman molekyyllilajin,
10 joka mahdollistaa kovalentin kytkemisen biologiseen molekyyliin toimintaolosuhteissa, jotka sopivat yhteen tämän biologisen reaktiivisuuden kanssa.

Näistä molekyyllilajeista voidaan mainita ei-rajavana esimerkkeinä alkyyliamino-, aryyliamino-, isotiosyaani-, syaani-, isosyaani-, tiosyaani-, karboksyyli-,
15 hydroksyyli-, merkapto-, fenoli-, imidatsoli-, aldehydi-, epoksidi-, halogenidi-, tionyyli-, sulfonyyli-, nitro-bentsoyyli-, karbonyyli-, triatso-, sukkinimido-, anhydridi-, halogeeniasetaatti-, hydratsino-, dihalogeenitriatsinyyli- jne. radikaalit (Biol. Chem. 245 (1970) 3059).
20 Ketjun, joka yhdistää kryptaatin kiinnostavaan biologiseen molekyyliin, pituus voi vaihdella esimerkiksi yhdestä 20:een atomiin ja ketju voi sisältää hiiliatomien ohella myös heteroatomeja kuten N, O, S, P.

25 Nyt on löydetty kaksi ryhmää funktionaalisia harvinaisten maametallien kryptaatteja, joita voidaan käyttää biologisten molekyylien fluoresoivina merkkeinä.

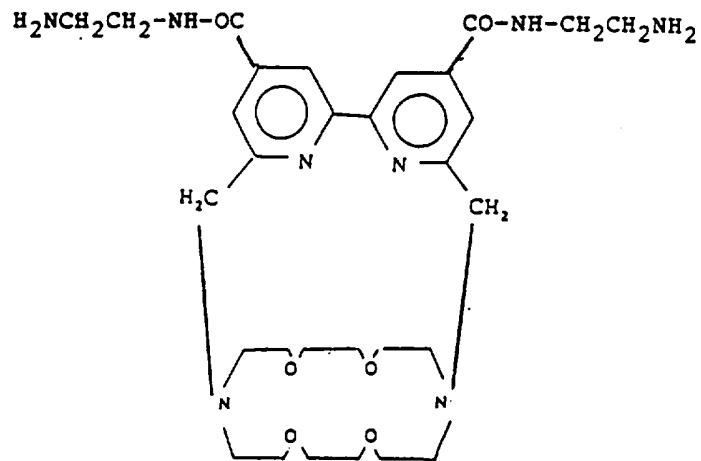
Keksintö koskee myös menetelmiä näiden kryptaattien saamiseksi, sekä synteessin välituoteyhdisteitä.

30 Keksintö koskee myös näiden harvinaisten maametallien kryptaattien käyttöä biologisten aineiden fluoresoivina merkkeinä.

Keksintö koskee siten harvinaisten maametallien 2,2-bipyridyylikryptaatteja, jotka koostuvat vähintään
35 yhdestä harvinaisen maametallin suolasta, joka on valittu

ryhmästä nitraatti, kloridi, asetaatti ja trifluoriase-
taatti ja joka on kompleksoitu substituoituun bipyridii-
nijohdannaiseen, jolla on kaava Ia, Ib, IIa tai IIb

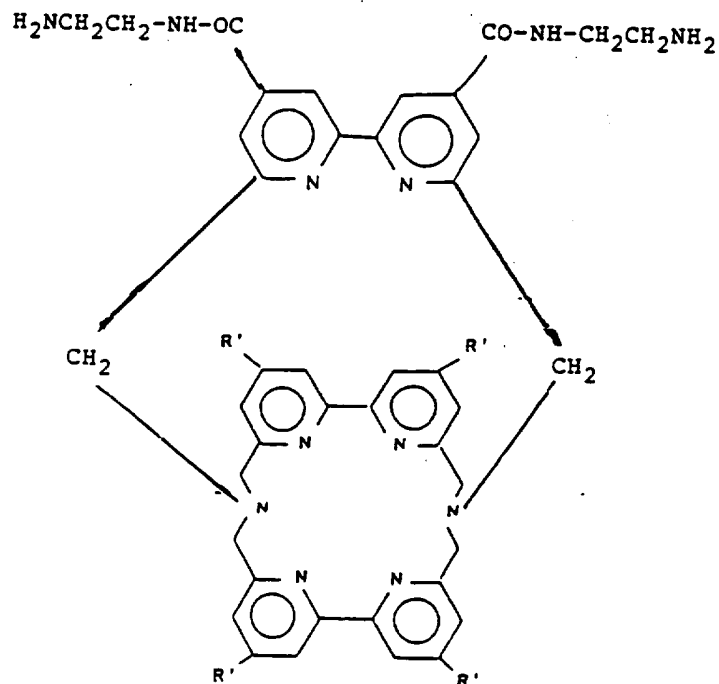
5



(Ia)

10

15



(Ib)

20

25

5

10

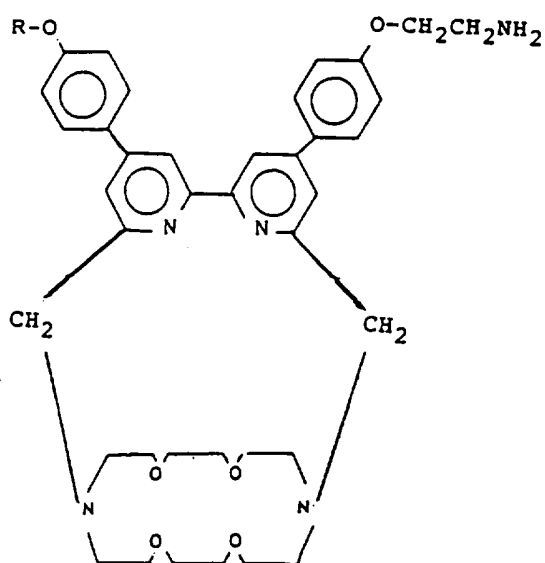
15

20

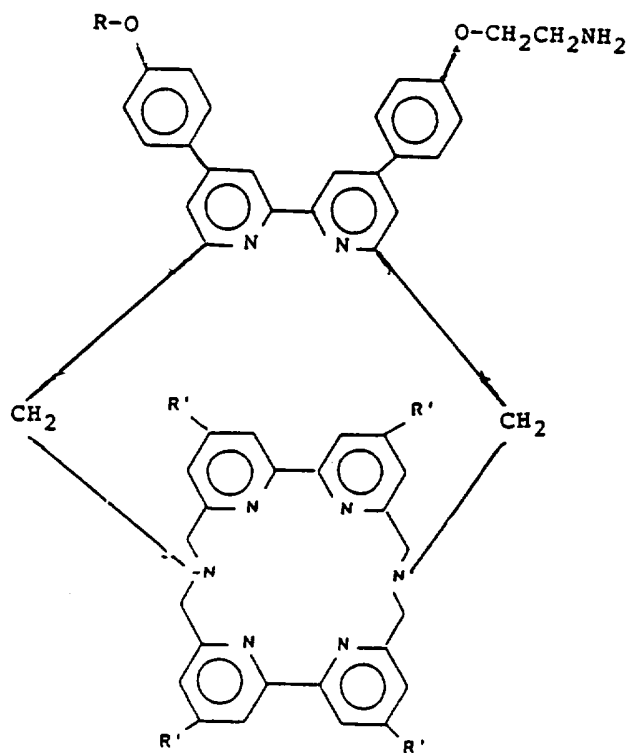
25

30

35



(IIa)

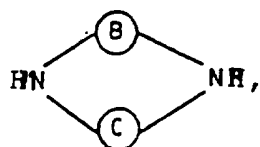


(IIb)

Kaavan I ja II mukaisten yhdisteiden pyridyyli-
kaan 4-asemassa olevan substituentin pääteaminoryhmät on
aktivoitava ennen kovalenttia kytkemistä biologiseen ai-
neeseen.

5 Yleensä ottaen keksinnön mukaiset kryptaatit voi-
daan saada joko

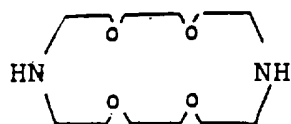
kondensoimalla rengas
tarkoittaa



joka

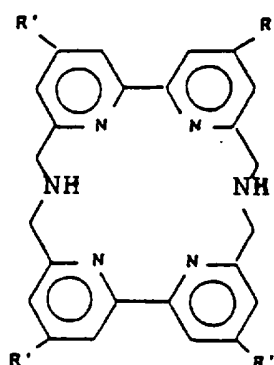
10

ryhmää



makrosykli (22)

tai



bis-bipyridiinimakrosykli

15

20 6,6'-dihalogeenimetyyli-2,2'-bipyridiiniin, joka on di-
substituoitu asemissa 4,4', substituomalla sitten ryh-
mällä -NH-Y-Z tai ryhmällä -Y-Z, jossa Y on CH₂-CH₂ ja Z
on NH₂ ja kompleksoimalla saatu makropolysyklinen yhdiste
harvinaisen maametallin suolaan, tai

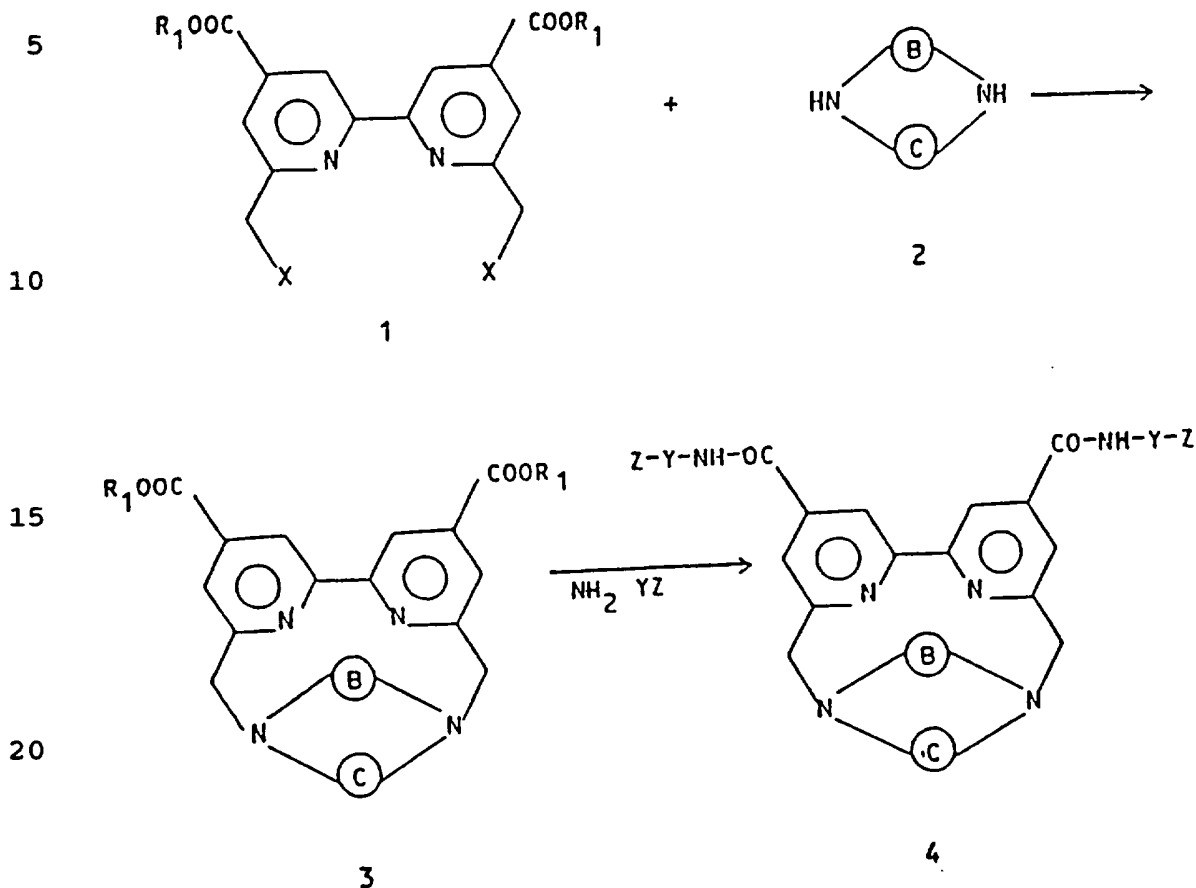
25 kondensoimalla 6,6'-diaminometyyli-2,2'-bipyridii-
nimolekyyli, joka on disubstituoitu asemissa 4,4', kah-
teen 6,6'-dihalogeenimetyyli-2,2'-bipyridiinimolekyyliin,
jotka on disubstituoitu asemissa 4,4', substituomalla
sitten ryhmällä -NH-Y-Z tai ryhmällä -Y-Z ja kompleksoi-
30 malla saatu makropolysyklinen yhdiste harvinaisen maame-
tallin suolaan.

35 Todetaan, että edeltävissä menetelmissä komplek-
sointi harvinaisen maametallin suolaan voidaan suorittaa
ennen substituointivaihetta. Tämä kompleksointi suorite-
taan edullisesti ennen substituointivaihetta.

..

Eri menetelmiä keksinnön mukaisten kryptaattien saamiseksi kuvataan nyt yksityiskohtaisesti.

Menetelmä A:



jossa X on halogeeniryhmä ja R_1 on 1 - 10 hiiliatomia sisältävä alkyyliryhmä ja on edullisesti metyyli-, etyyli- tai tert-butyyli-ryhmä.

Tämän menetelmän mukaan bipyridiinin halogeenijohdannainen 1 kondensoidaan makrosykliin 2.

Tämä reaktio suoritetaan edullisesti vedettömässä orgaanisessa liuottimessa, kuten esimerkiksi asetonitrilissä emäksen, kuten alkali-ionikarbonaatin, esimerkiksi natriumkarbonaatin tai litiumkarbonaatin läsnäollessa liuottimen palautusjäähdytyslämpötilassa. Saatu makrosykli 3 on siten alkali-ionikryptaatin muodossa ja sitä käytetään esimerkiksi natriumkryptaatin muodossa.

...

Tämän jälkeen suoritetaan makrobisyklisen yhdisteen 3 aminolyysi saattamalla se reagoimaan amiinin kanssa, jonka kaava on H_2N-Y-Z , jossa ryhmät Y ja Z ovat kuten aiemmin määritelty, jolloin funktionaalinen ryhmä Z on mahdollisesti salvattu tavanomaisin keinoin. Edullisesti työskennellään typpisuojausolosuhteissa ja ympäristön lämpötilassa. Reaktion päätyttyä amiiniylimäärä poistetaan sopivalla tavalla ja kaavan 4 mukainen kryptaatti otetaan talteen tavanomaisin keinoin.

10 Näin saatu yhdiste muutetaan sitten harvinaisen maametallin kryptaatiksi ionivaihdolla keittämällä palautusjäähdyttämällä liuosta, jossa on makrobisyklin alkali-ionikryptaatti 4 metanolissa, mahdollisesti kloroformin läsnäollessa liuoksen kanssa, jossa on harvinaisen maametallin halogenidi metanolissa.

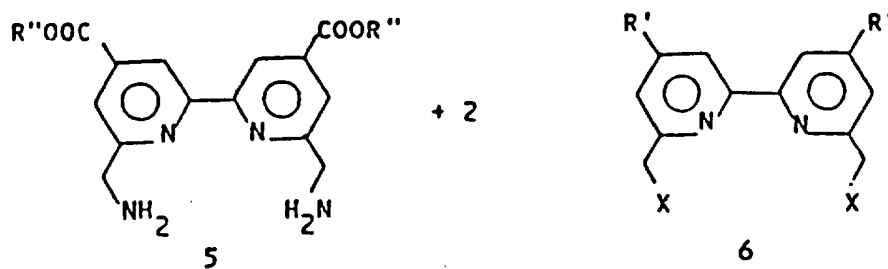
15 Kuten aiemmin on mainittu, alkali-ionikryptaatti 3 voidaan ennen aminolyysiä muuttaa harvinaisen maametallin kryptaatiksi ionivaihdolla edellä kuvatun suoritustavan mukaan.

20 Makrobisyklinen yhdiste 3 on avainväliaine keksinnön mukaisten kryptaattien synteesissä. Tämä väliaine voi olla alkali-ionikryptaatin tai harvinaisen maametallin kryptaatin muodossa. Sekin muodostaa keksinnön yhden kohteen. Keksinnön tarkoituksiin erityisen edullisia välituotteita ovat kaavan 3 mukaiset yhdisteet, joissa R_1 on ryhmä CH_3 , C_2H_5 tai $t-C_4H_9$.

25 Tämän menetelmän erään suoritustavan mukaan alkali-ionikryptaatti voidaan dekompleksoida muuttamalla se ensin vastaavaksi hopeakryptaatiksi käyttämällä ylimäärää hopeanitraattia, minkä jälkeen saatua yhdistettä käsitellään rikkivedyllä (H_2S) [Helvetica Chimica Acta 67 (1984) 2264 - 2269]. Täten saadaan makropolysyklinen yhdiste 3 vapaan kryptantien muodossa, joka niinkään on synteesiväliaine ja joka voidaan sitten kompleksoida tavanomaisin
35 keinoin harvinaisen maametallin kryptaatiksi.

Todetaan, että kaavan (I) tai (II) mukaiset kryptaattit, joissa Z on muu kuin aminoryhmä, voidaan saada lähtemällä kaavan (I) tai (II) mukaisista kryptaateista, joissa Z on aminoryhmä, käyttäen tavanomaisia, alan ammattilaiselle tuttuja menetelmiä.

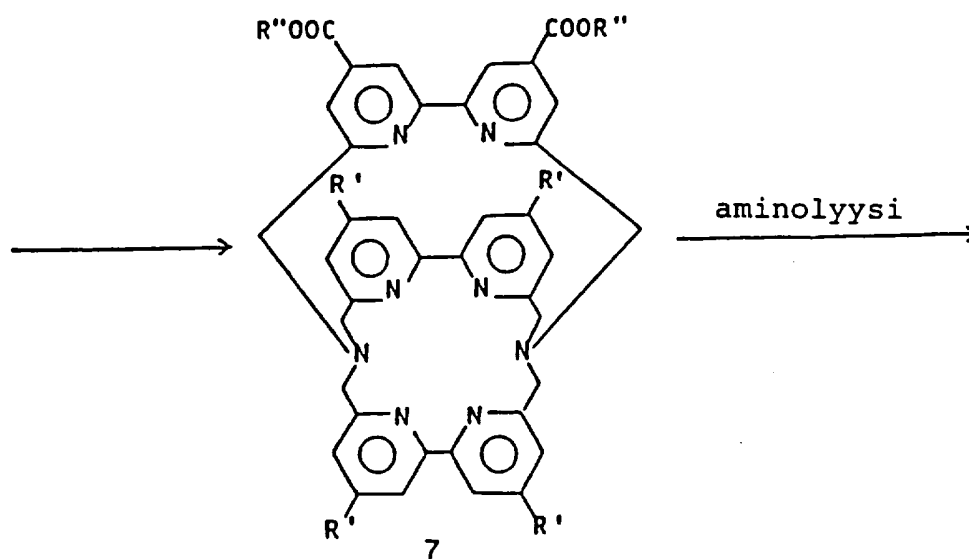
5

Menetelmä B:

10

15

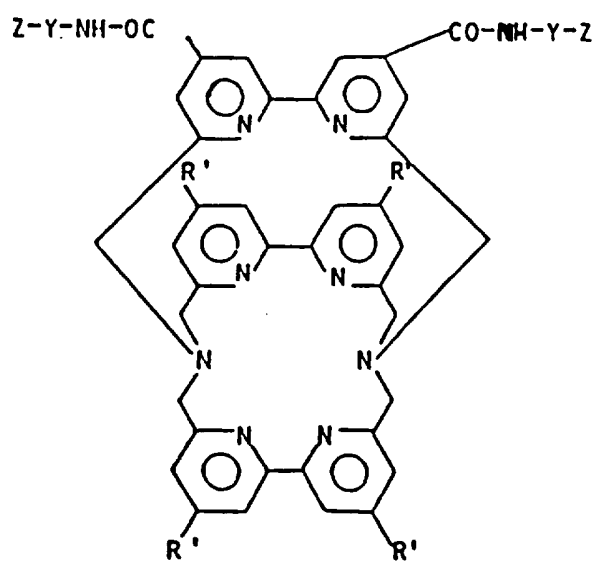
20



25

30

35



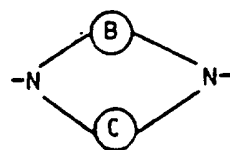
...

Tämän menetelmän mukaan kaksi halogeenijohdannais-
molekyyliä 6 kondensoidaan yhteen amiinijohdannaismole-
kyyliin 5. Edullisesti työskennellään samoissa olosuh-
teissa kuin menetelmän A ensimmäisessä vaiheessa, jolloin
5 siis tämä kondensointi suoritetaan vedettömässä orgaani-
sessa liuottimessa, kuten asetonitriilissä emäksen, kuten
alkali-ionikarbonaatin, esimerkiksi natriumkarbonaatin
tai litiumkarbonaatin läsnäollessa. Työskennellään
liuottimen palautusjäähdytyslämpötilassa. Saadaan makro-
10 polysyklinen yhdiste 7, joka on avainvälituote keksinnön
mukaisten kryptaattien synteesisissä ja joka samoin kuuluu
keksintöön. Tämä makropolysyklinen kompleksi on alkali-
ionikryptaatin muodossa, joka edullisesti muutetaan har-
vinaisen maametallin kryptaatiksi ennen aminolyysiä aiem-
15 min määritellyn suoritustavan mukaan. Kuten menetelmässä
A alkali-ionikryptaatti 7 voidaan erään suoritustavan
mukaan dekompleksoida vastaavan makropolysyklisen yhdis-
teen 7 tai vapaan kryptantin saamiseksi, joka sitten uu-
delleenkompleksoidaan harvinaisen maametallin kryptaatik-
20 si.

Sen jälkeen suoritetaan yhdisteen 7 aminolyysi
aiemmin määritellyn suoritustavan mukaan ja saadaan mak-
ropolysyklinen kompleksi 8, eli keksinnön mukainen kryp-

25

taatti, jonka kaava on I_b , jossa



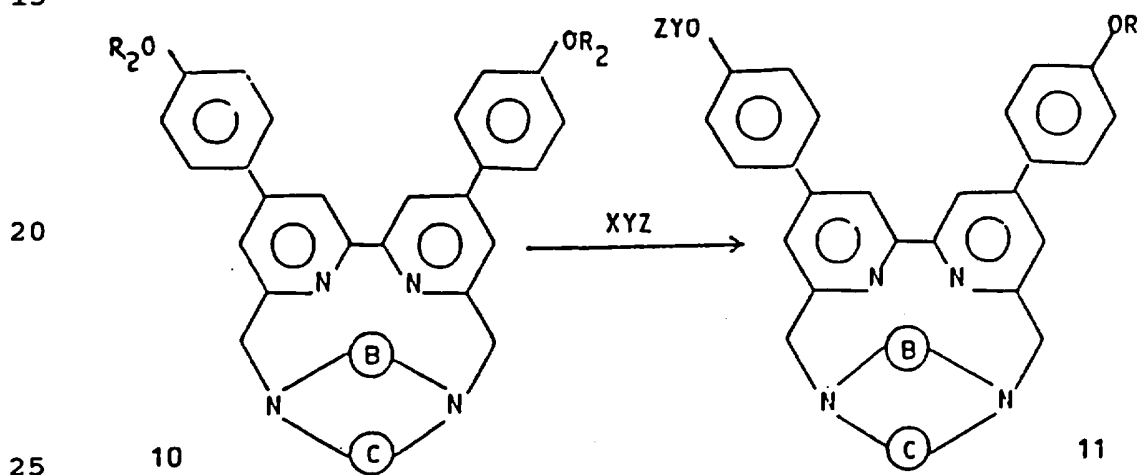
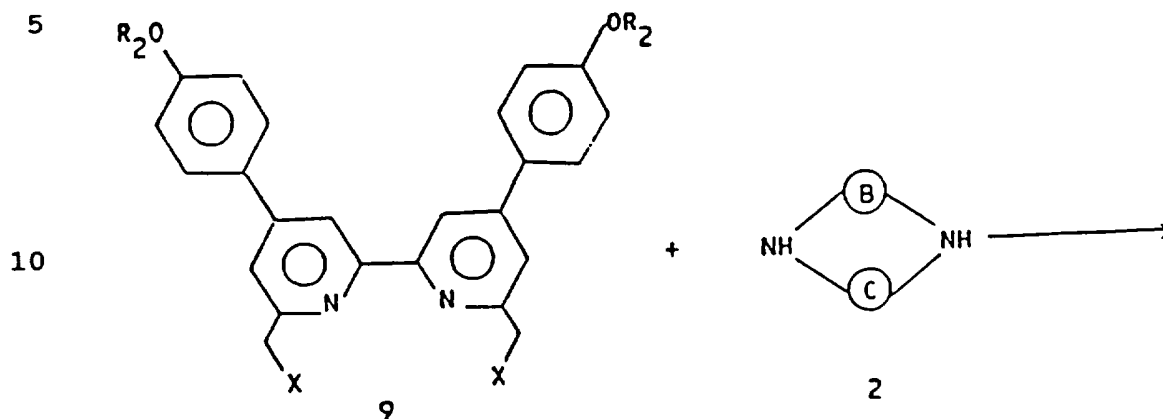
on

30 bis-bipyridiinimakrosykli ja Y, Z ja R' ovat kuten aiem-
min on määritelty.

Amiinijohdannainen 5, joka käytetään lähtöaineena
menetelmässä B, saadaan lähtemällä halogeenijohdannais-
ta 1, joka muutetaan vastaavaksi atsidoyhdisteeksi reak-
tiossa NaN_3 :n kanssa keittämällä palautusjäähdyttäen or-
35 gaanisessa liuottimessa, kuten tetrahydrofuraanissa, min-

kä jälkeen näin saatu atsidoyhdiste pelkistetään pelkistuskatalyytin kuten palladium-hiilen läsnäollessa vetyilmakehässä ympäristön lämpötilassa.

Menetelmä C:



Tämän suoritusmuodon mukaan bipyridiinin sopivasti substituoitu halogeenijohdannainen 9 kondensoidaan ensin makrosykliin 2. Tämä reaktio suoritetaan edullisesti vedettömässä orgaanisessa liuottimessa, kuten esimerkiksi asetonitriilissä emäksen, kuten alkali-ionikarbonaatin, esimerkiksi natriumkarbonaatin tai litiumkarbonaatin läsnäollessa. Näin saadaan makropolysyklinen yhdiste 10 alkali-ionikryptaatin muodossa. Edullisesti työskennellään liuottimen palautusjäähdytyslämpötilassa.

30

35

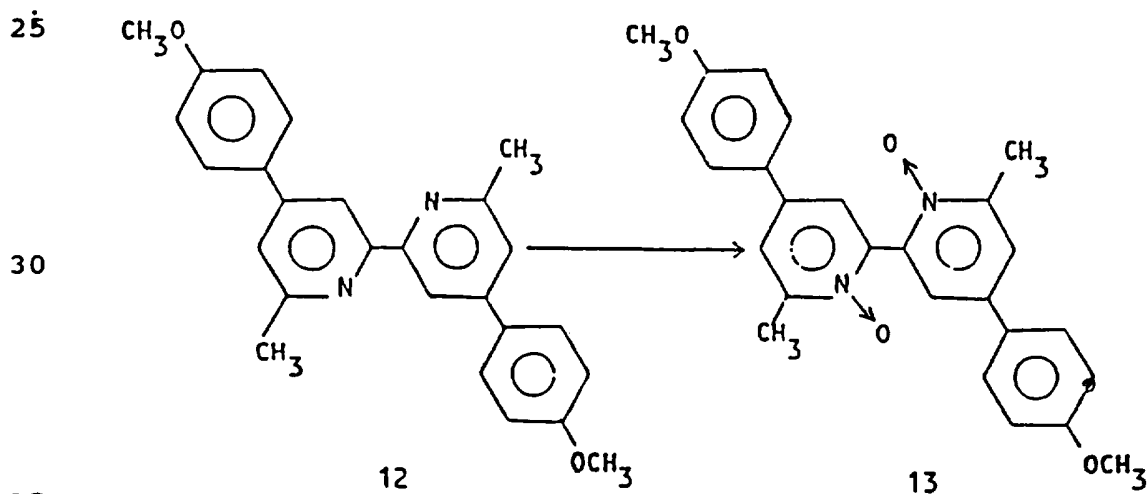
Sen jälkeen makropolysyklinen yhdiste 10 substi-
tuoidaan saattamalla tämä yhdiste 10 reagoimaan halogeni-
din kanssa, jonka kaava on XYZ, jolloin Z ja Y ovat kuten
aiemmin on määritelty ja X on halogenidi-ioni.

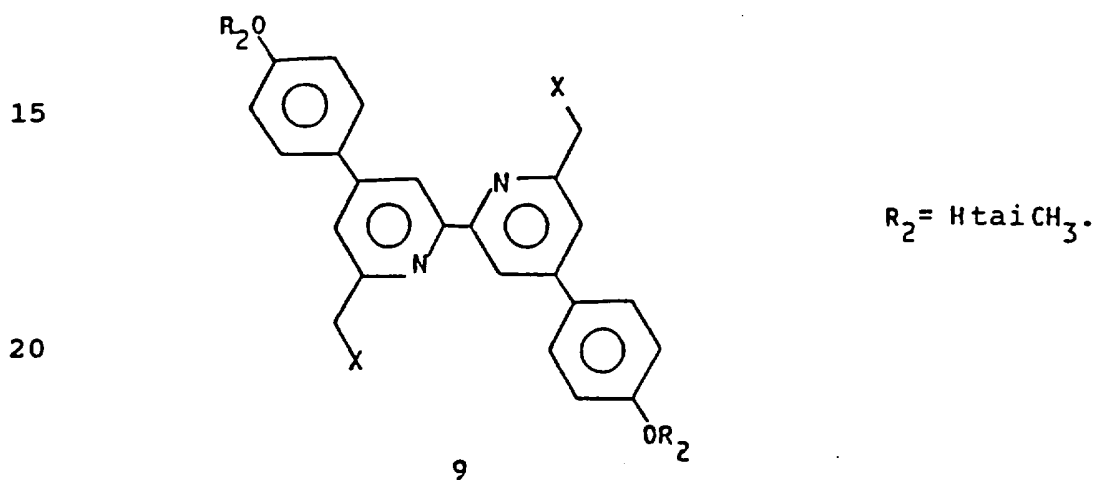
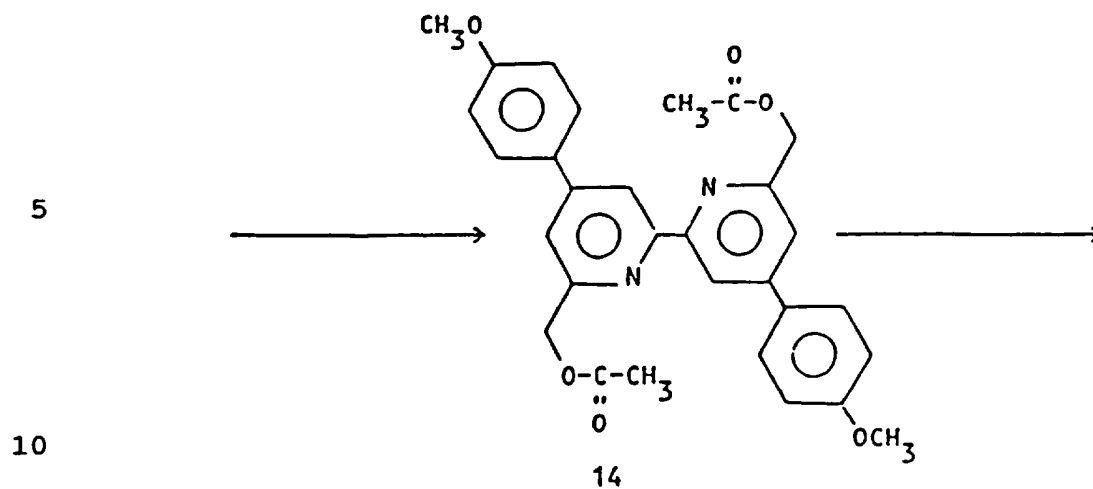
5 Saatu yhdiste 11 muutetaan sitten harvinaisen
maametallin kryptaattiksi ionivaihdolla, esimerkiksi aiem-
min määritellyn suoritustavan mukaan. Edullisesti harvi-
naisen maametallin halogenidi liuotetaan metanoliin ja
liuokseen lisätään liuos, jossa on alkali-ionikryptaattia
10 metanolissa, sekä tarvittaessa pieni tilavuus klorofo-
rmiä. Seosta keitetään palautusjäähdyttämällä inertissä suo-
jakaasussa ja alkali-ionikryptaatin häviämistä seurataan
ohutlevykromatografisesti.

Erään suoritustavan mukaan alkali-ionikryptaatti
15 voidaan dekompleksoida aiemmin määritellyn suoritustavan
mukaan (katso menetelmä A) ja muuttaa halutuksi harvinais-
en maametallin kryptaattiksi.

Reaktion päätyttyä harvinaisen maametallin kryp-
taatti eristetään reaktioseoksesta tavanomaisten menetel-
20 mien mukaan. Se saadaan kiteisenä kiinteänä aineena.

Bipyridiinin halogeenijohdannainen 9, jota edeltä-
vässä suoritustavassa käytetään, voidaan saada menetel-
män mukaan, jota esittää seuraava reaktiokaavio:





25 Kaavan 12 mukainen 6,6'-dimetyyli-4,4'-di(p-metoksifenyyli)-2,2'-bipyridiini voidaan saada lähtemällä 1,6-di(p-metoksifenyyli)-1,5-heksadieeni-3,4-dionista Kröhnken menetelmän mukaan, joka kuvataan julkaisussa Synthesis 1976, 1.

30 Yhdiste 13 saadaan saattamalla yhdiste 12 reagoimaan m-klooriperbentsoehapon kanssa orgaanisessa liuotimessa, kuten kloroformissa.

35 Sitten valmistetaan johdannainen 14 keittämällä palautusjäähdyttämällä lietettä, jossa on yhdiste 13 asetanhydridissä.

Keittämällä palautusjäähdyttäen liuosta, jossa on yhdiste 14 sekä halogeenivetyhappoa etikkahappoliuoksessa, saadaan yhdiste 9, jossa R_2 on H tai CH_3 , jolloin ainakin toinen radikaaleista R_2 on vety.

5 Kaavan 9 mukainen yhdiste on avainväliaine keksinnön mukaisten yhdisteiden saamiseksi ja muodostaa edelleen keksinnön kohteen.

10 Keksinnön mukaiset yhdisteet, jotka ovat stabiileja ja harvinaisten maametallien kryptaatteja, ovat liukoisia veteen ja tiettyihin orgaanisiin liuottimiin, kuten metanoliin tai DMSO:hon.

15 Keksinnön mukaiset yhdisteet ovat hyödyllisiä biologisten yhdisteiden fluoresoivina merkkeinä ja ovat siten käyttökelpoisia mittausreagensseja fluoresenssiin perustuvissa immunologisissa toteamis- ja määritysmenetelmissä, jolloin ne soveltuvat yhtä hyvin ns. kilpailumittauksiin kuin ns. ylimäärämittauksiinkin.

Tämän jälkeen keksintöä kuvataan yksityiskohtaisemmin seuraavissa havainnollistavissa esimerkeissä.

20 Esimerkki 1

[(22) (p-OCH₃-p-OCH₂CH₂NH₂-diPhbpy)]:n harvinaisen maametallin -kryptaatti

Kaava IIa: R = CH₃ (menetelmä C)

25 A. 6,6'-dimetyyli-4,4'-di(p-metoksifenyyli)-2,2'-bipyridiini (yhdiste 12)

30 Seosta, jossa on 1,6-di(p-metoksifenyyli)-1,5-heksadieeni-3,4-dionia (3,07 g, 9,5 mmol), joka on valmistettu Kröhnken (Synthesis 1976, 1) menetelmän mukaan, 1-pyridiniumpropan-2-onikloridia (3,27 g, 19,1 mmol), joka on saatu sekoittamalla ekvimolaariset määrät pyridiiniä ja 1-klooriasetonia, ja ammoniumasetaatia (19 g) 35 95,5 ml:ssa metanolia, keitetään palautusjäähdyttäen 38 tunnin ajan typpisuojavaasissa. Reaktioseoksen jäähdyttyä ympäristön lämpötilaan muodostunut kerman värinen sakka suodatetaan eroon ja pestään metanolilla. Raakatuotetta

käytetään ilman lisäpuhdistusta. Se voidaan kiteyttää metyleenikloridi/heksaanista.

Saanto: 70 %.

5 TLC: $R_f = 0,5$ (silikageeli, metyleenikloridi/metanolili, 95:5)

MS: 396 (M^+), 381 ($M^+ - CH_3$), 365 ($M^+ - 2CH_3$), 353 ($M^+ - CH_3 - CO$), 338 ($M^+ - 2CH_3 - CO$), 198 ($M^+/2$).

B. **1,1'-di(N-oksiidi)-6,6'-dimetyyli-4,4'-di(p-metoksifenyyli)-2,2'-bipyridiini** (yhdiste 13)

10 Liuokseen, jossa on yhdistettä 12 (3,45 g, 8,7 mmol) 800 ml:ssa kloroformia, lisätään tipoittain 0 °C:ssa liuos, jossa on m-klooriperbentsoehappoa (6 g, 34,8 mmol) 360 ml:ssa kloroformia. Seosta pidetään yön yli ympäristön lämpötilassa sitä samalla sekoittaen. Sit-

15 ten seosta pestään kyllästetyllä natriumbikarbonaattiliuoksella kunnes pH on alkalinen, minkä jälkeen orgaaninen faasi erotetaan ja haihdutetaan kuiviin. Haluttu yhdiste saadaan saostumaan lisäämällä jäännökseen heksaania. Sakka suodatetaan eroon ja liuotetaan sitten takaisin metyleenikloridi/metanoliiin (90:10), minkä jälkeen

20 liuos pestään 2 N natriumhydroksidiliuoksella. Yhdisteen 13 sisältävä orgaaninen faasi erotetaan ja liuotin poistetaan haihduttamalla. Toisaalta saostuksesta saatu suodos pestään samoin 2 N natriumhydroksidiliuoksella, minkä

25 jälkeen se haihdutetaan kuiviin ja jäännöksellä suoritetaan kromatografia-ajo aluminiumoksidikolonissa metyleenikloridilla eluoiden.

Saanto: 80 %. Sp. > 250 °C.

30 TLC: $R_f = 0,5$ (aluminiumoksidi, metyleenikloridi/metanolili, 95:5).

MS: 429 (MH^+), 411 ($M^+ - H_2O$).

C. **6,6'-diasetoksimetyyli-4,4'-di(p-metoksifenyyli)-2,2'-bipyridiini** (yhdiste 14)

35 Lietettä, jossa on yhdistettä 13 (1,21 g, 2,82 mmol) 18 ml:ssa asetanhydridiä, keitetään palautusjääh-

dyttäen 1,5 tunnin ajan, minkä jälkeen saatu liuos haihdutetaan kuiviin. Tahnaiseen jäännökseen lisätään 5 ml vettä ja 20 ml metyleenikloridia ja seos tehdään emäksi-

5 liuosta. Orgaaninen faasi erotetaan ja vesifaasi uutetaan kahteen kertaan 30 ml:lla metyleenikloridia. Saatu orgaaninen faasi kuivataan natriumsulfaatilla ja liuotin poistetaan haihduttamalla. Raakatuotteella suoritetaan kromatografia-ajo aluminiumoksidikolonnissa metyleenikloridilla

10 eluoiden.

Saanto: 90 %. Sp. 140 - 141 °C.

TLC: $R_f = 0,9$ (aluminiumoksidi, metyleenikloridi/metanolili, 95:5).

MS: 513 (MH^+), 469 ($M^+ - C(O)CH_3$), 453 ($M^+ - CH_3COOH$),

15 256 ($M^+/2$).

D. **6,6'-dibromimetyyli-4,4'-di(p-metoksifenyyli)-2,2'-bipyridiini** (yhdiste 9a: $R_2 = CH_3$)

6,6'-dibromimetyyli-(4-p-metoksifenyyli-4'-p-hydroksifenyyli)-2,2'-bipyridiini (yhdiste 9b: toinen radikaaleista R_2 on H, toinen on CH_3)

20

Liuosta, jossa on yhdistettä 14 (0,31 g, 0,60 mmol) 5 ml:ssa 33-%:ista HBr/AcOH -seosta, keitetään palautusjäähdyttäen 12 - 13 tunnin ajan. Liuokseen lisätään ympäristön lämpötilassa 20 ml vettä ja 60 ml kloroformia,

25 minkä jälkeen seosta pestään kyllästetyllä natriumbikarbonaattiliuoksella kunnes se on neutraali. Orgaaninen faasi erotetaan ja vesifaasi uutetaan kahteen kertaan 20 ml:lla metyleenikloridia. Saadusta orgaanisesta faasista poistetaan liuotin haihduttamalla ja jäännöksellä suoritetaan kromatografia-ajo aluminiumoksidikolonnissa eluoiden ensin metyleenikloridilla ja sitten metyleenikloridi/metanolilla (95:5).

30

Yhdiste 9a: $R_2 = CH_3$; saanto: 16 %; hajaantuu 210 - 215 °C:ssa.

35 TLC: $R_f > 0,9$ (aluminiumoksidi, metyleenikloridi/-

metanoli, 95:5).

MS: 556, 555, 553 (M^+), 556, 554, 552 (M^+), 475, 473 (M^+-Br), 394 (M^+-2Br).

5 Yhdiste 9b: toinen radikaaleista R_2 on H; saanto: 35 %.

TLC: $R_f = 0,4$ (aluminiumoksidi, metyleenikloridi/-metanoli, 95:5).

MS: 542, 540, 538 (M^+), 461, 459 (M^+-Br), 380 (M^+-2Br).

10 E. [(22) (p-OCH₃-p-OH-diPhbpy)]-natriumkryptaatti (yhdiste 10)

Seosta, jossa on makrosykliä (22) (0,262 g, 1 mmol) ja natriumkarbonaattia (1,05 g, 10 mmol) 600 ml:ssa vedetöntä metyyllisyanidia, keitetään palautusjäähdyttämällä 15 30 minuutin ajan typpisuojavaasissa. Sen jälkeen seokseen lisätään liete, jossa on yhdistettä 9b (0,54 g, 1 mmol) 450 ml:ssa vedetöntä metyyllisyanidia. Seosta keitetään palautusjäähdyttämällä 20 tunnin ajan typpisuojavaasissa. Saatu liuos suodatetaan kuumana ja liuotin haihdutetaan 20 eroon. Raakatuotteella suoritetaan kromatografia-ajo alu- miniumoksidikolonissa metyleenikloridi/metanolilla (95:5) eluoiden.

Saanto: 60 - 65 %.

25 TLC: $R_f = 0,6$ (aluminiumoksidi, metyleenikloridi/-metanoli, 90:10).

MS: 663 (M^+), 640 (M^+-Na), 625 ($M^+-Na-CH_3$), 609 ($M^+-Na-OCH_3$), 595 ($M^+-Na-OCH_3-OH$).

F. [(22) (p-OCH₃-p-OCH₂CN-diPhbpy)]-natriumkryp- taatti (yhdiste 11a: Z = CN; Y = CH₂; R = CH₃)

30 Liuokseen, jossa on yhdisteen 10 natriumkryptaat- tia (0,042 g, 0,066 mmol) mahdollisimman pienessä tila- vuudessa metyyllisyanidia, lisätään ylimäärin natrium- hydridiä (jauhemaisena) typpisuojavaasissa, ja seosta keitetään palautusjäähdyttämällä typpisuojavaasissa 1 tunnin 35 ajan. Liuos jäähdytetään ympäristön lämpötilaan, minkä

jälkeen siihen lisätään bromiasetonitriiliä (1,2 ekvi-
valenttia). Seosta sekoitetaan yön yli ympäristön lämpö-
tilassa typpisuojavaasissa. Seokseen lisätään 20 ml vettä
ja 10 ml metyleenikloridia, minkä jälkeen se neutraloi-
5 daan lisäämällä kyllästettyä natriumbikarbonaattiliuosta.
Orgaaninen faasi erotetaan ja vesifaasi uutetaan kahteen
kertaan 20 ml:lla metyleenikloridia. Saatu orgaaninen
faasi kuivataan natriumsulfaatilla, minkä jälkeen liuot-
timet poistetaan haihduttamalla. Raakatuotteella suorite-
10 taan kromatografia-ajo aluminiumoksidikolonissa metylee-
nikloridi/metanolilla (96:4) eluoiden.

Saanto: 75 %.

TLC: $R_f = 0,5$ (sinivioletti täplä) (aluminiumoksi-
di, metyleenikloridi/metanoli 92,5:7,5)

15 MS: 702 (M^+), 679 (M^+-Na), 663 ($M^+-Na-H-CH_3$), 654
($MH^+-Na-CN$), 640 ($MH^+-Na-CH_2CN$).

G. [(22)(p-OCH₃-p-OCH₂CH₂NH₂-diPhbpy)]-natriumkryp-
taatti (yhdiste 11b: Z = NH₂; Y = -CH₂-CH₂; R = CH₃)

Lietteeseen, jossa on yhdistettä 11a (0,078 g,
20 0,1 mmol) 8 ml:ssa vedetöntä THF:ää, lisätään 2 ml B₂H₆-
liuosta (1 M liuos THF:ssä) ja 5 ml ylimääräistä THF:ää.
Seosta pidetään yön yli ympäristön lämpötilassa sitä sa-
malla sekoittaen. Seokseen lisätään 10 ml metanolia, min-
kä jälkeen sitä sekoitetaan 20 - 30 minuutin ajan. Liuot-
timet poistetaan haihduttamalla ja jäännökseen lisätään
25 20 ml vettä ja konsentroidun kloorivetyhapon seosta
(1:1), jolloin muodostuu keltaista sakkaa ja vapautuu
kaasua liukenemisen tapahtuessa vähittäin. Liuottimet
poistetaan haihduttamalla ja saatuun jäännökseen lisätään
30 natriumhydroksidin vesiliuosta (6 N). Amiini 11b uutetaan
25 ml:lla metyleenikloridia, josta saanto on kvantitatiiv-
vinen. Yhdisteen muodostuminen todetaan ¹H-nmr:n avulla.

H. Kompleksointireaktio: natriumin vaihto ioniin
Ln³⁺ (Eu, Tb)

35 LnCl₃.xH₂O:ta (0,1 mmol) liuotetaan 25 ml:aan me-

tanolia ja liuokseen lisätään liuos, jossa on edellä saatu natriumkryptaattia (0,06 mmol) 4 - 8 ml:ssa kloroformia (minimitilavuus). Seosta keitetään palautusjäähdyttämällä typpisuoja-
 5 natriumkryptaatista riippuen). Natriumkryptaatin häviämistä seurataan TLC:n avulla (aluminiumoksidi, metyleenikloridi/metanoli, 90:10). Kun reaktio on päättynyt, reaktioseos suodatetaan tarvittaessa ja liuottimet poistetaan haihduttamalla. Jäännös uudelleenliuotetaan 15 - 20
 10 ml:aan metanolia ja liuokseen lisätään eetteriä, kunnes samanema säilyy (5 ml:sta 25 - 30 ml:aan). Muodostunut harvinaisen maametallin kryptaatti kiteytyy tai saostuu hyvin nopeasti tai usean tunnin kuluttua, kryptaatin luonteesta riippuen. Kryptaatin muodostus todetaan ¹H-
 15 nmr:llä ja UV-spektroskooppisesti näkyvän valon alueella.

Tämän suoritusmuodon mukaan saatiin vastaavasti kaavan 11 mukaiset europium- ja terbiumkryptaatit, joilla on seuraavat spektriominaisuudet:

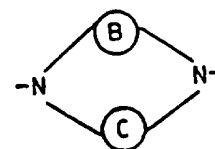
20 Europiumkryptaatti: UV/näkyvä, metanolissa: 280 nm maksimi; 292 nm olkapiikki; 320 nm maksimi.

Terbiumkryptaatti: UV/näkyvä, vedessä: 282 nm; 310 nm olkapiikki.

Esimerkki 2

25 [bpy.bpy.(p-OCH₃-p-OCH₂CH₂NH₂-diPhbpy)]:n harvinaisen maametallin kryptaatti

R = CH₃; Y = -CH₂-CH₂-; Z = NH₂; R' = H;



on bis-bipyridiinimakrosykli (menetelmä C).

30 A. [bpy.bpy.(p-OCH₃-p-OH-diPhbpy)]-natriumkryptaatti (yhdiste 10b)

Seosta, jossa on bis-bipyridiinimakrosykliä (0,48 g, 1,21 mmol) ja natriumkarbonaattia (1,16 g, 11 mmol) 480 ml:ssa vedetöntä metyyllisyanidia, keitetään
 35 palautusjäähdyttämällä 30 minuutin ajan typpisuoja-
 :

Seokseen lisätään liete, jossa on 6,6'-dibromimetyyli-(4-p-metoksifenyyli-4'-p-hydroksifenyyli)-2,2'-bipyridiiniä, joka valmistettiin aiemmin (katso esimerkki 1, kohta D) (0,65 g, 1,20 mmol), 340 ml:ssa metyyliisyanidia. Saatua liuosta keitetään palautusjäähdyttären 24 tunnin ajan typpisuo-
5 pisuojakaasussa. Reaktioseoksen jäähdyttyä ympäristön lämpötilaan se suodatetaan ja liuotin poistetaan haihduttamalla. Raakatuotteella suoritetaan kromatografia-ajo alu-
10 miniumoksidikolonissa metyleenikloridi/metanolilla (98:2) eluoiden.

Saanto: 45 %.

TLC: $R_f = 0,4$ (aluminiumoksidi, metyleenikloridi/metanolili, 90:10), violetti täplä (254 nm), vihreä täplä (366 nm).

15 MS: a) IC (NH_3): 795 (M^+), 773 ($\text{MH}^+ - \text{Na}$).

b) FAB⁺ (tioglyseroli): 875 (MBr^+), 795 (M^+).

Saatu natriumkryptaatti muutettiin terbiumkryptaattiksi esimerkissä 1H kuvattua suoritustapaa noudattaen. Tällä kryptaatilla on seuraavat spektriominaisuudet:

20 UV/näkyvä, vedessä: 244 nm (maksimi); 303 nm (maksimi).

UV/näkyvä, metanolissa: 244 nm (maksimi); 301 nm (maksimi); 318 nm (olkapiikki).

25 **B. [bpy.bpy.(p-OCH₃-p-OCH₂CN-diPhbpy)]-natriumkryptaatti**

Liuokseen, jossa on yhdisteen 10b natriumkryptaattia (0,21 g, 0,24 mmol) 12 ml:ssa metyleenikloridia ja 12 ml:ssa metanolia, lisätään liuos, jossa on natriumhydroksidia metanolissa (1,5 ekvivalenttia 2 ml:ssa). Seosta
30 keitetään palautusjäähdyttären 1,5 tunnin ajan typpisuo-
jakaasussa. Sitten seoksen jäähdyttyä ympäristön lämpötilaan liuotin poistetaan haihduttamalla; reaktiossa muodostunut vesi poistetaan tislaamalla atseotrooppisesti tolueenin kanssa. Näin saatua tuotetta kuivataan yön yli
35 siipipumppua käyttäen. Saatu, väriltään kirkkaan oranssi

tuote liuotetaan 35 ml:aan THF:ää (liuos on samea). Li-
sättäessä liuokseen bromiasetonitriiliä (30 mikrolitraa,
1,8 ekvivalenttia) liuos muuttuu läpikuultavaksi. Liuos
jätetään reagoimaan ympäristön lämpötilaan sitä samalla
5 sekoittaen typpisuojavaasun yön ajaksi. Liuokseen lisä-
tään 20 ml vettä ja noin 10 ml metyleenikloridia. Seos
neutraloidaan lisäämällä kyllästettyä natriumbikarbonaat-
tiliuosta. Orgaaninen faasi erotetaan ja vesifaasi uute-
taan kahteen kertaan 20 ml:lla metyleenikloridia. Saatu
10 orgaaninen faasi kuivataan natriumsulfaatilla, minkä jäl-
keen liuottimet poistetaan haihduttamalla. Raakatuotteel-
la suoritetaan kromatografia-ajo aluminiumoksidikolonnis-
sa metyleenikloridi/metanolilla (95:5) eluoiden.

Saanto: 92 %.

15 MS: FAB⁺ 834 (M⁺).

Saatu natriumkryptaatti muutettiin vastaavaksi
terbiumkryptaatiksi esimerkissä 1 kuvatun suoritustavan
mukaan. Tällä kryptaatilla on seuraavat spektriominaisuu-
det:

20 UV/näkyvä, metanolissa: 300 nm (maksimi); 314 nm
(olkapiikki).

**C. [bpy.bpy.(p-OCH₃-p-OCH₂CH₂NH₂-diPhbpy)]:n har-
vinaisen maametallin kryptaatti**

25 Noudattaen esimerkin 1 kohdassa G kuvattua suori-
tustapaa saadaan edeltävän yhdisteen harvinaisen maame-
tallin kryptaatti.

Esimerkki 3

[(bis-bpy)-bpy-di(amidoetyleeniamiini)]:n europi-
umkryptaatin valmistus (menetelmä A)

30 Kaavan Ib mukainen yhdiste: R' on vety.

**A. [(bis-bpy)-bpy-diesteri]natriumkryptaatin val-
mistus**

Kaavan 1 mukainen yhdiste, jossa R₁ on CH₃.

35 Seosta, jossa on 0,300 g (7,61 x 10⁻⁴ mol) bis-bi-
pyridiinimakrosykliä ja 1,10 g (10,4 x 10⁻³ mol) natrium-

karbonaattia, keitetään palautusjäähdyttäen 30 minuutin ajan 450 ml:ssa metyyllisyanidia. Sitten seokseen lisätään liuos, jossa on 0,350 g ($7,64 \times 10^{-4}$ mol) 6,6'-dibromimetyyli-(4,4'-p-dimetoksikarbonyyli)-2,2'-bipyridiiniä (yhdiste 1; X = Br) 375 ml:ssa metyyllisyanidia, samalla kii-
 5 vaasti sekoittaen 60 minuutin aikana. Sen jälkeen reaktioseosta keitetään ja sekoitetaan edelleen palautusjäähdyttäen 18 tunnin ajan, minkä jälkeen se jäähdytetään ympäristön lämpötilaan ja suodatetaan. Liuotin poistetaan
 10 haihduttamalla tyhjässä pyöröhaihduttimessa. Saatu kiinteä aine liuotetaan kloroformiin ja liuoksella suoritetaan kromatografia-ajo aluminiumoksidikolonissa (jonka päässä on vähän silikageeliä) eluoiden kloroformi/metanolilla (98:2). Liuottimet poistetaan tyhjässä haihduttamalla,
 15 jolloin saadaan 0,230 g (38 %) haluttua kompleksia. Tällä on seuraavat fysiko-kemialliset ominaisuudet:

Sulamispiste: > 240 °C.

^1H -nmr (CD_3OD): 3,89 (s, 8H, CH_2 -bpy), 3,98 (s, 4H, CH_2 -bpy-diE), 4,03 (s, 6H, COOCH_3), 7,42 (d, $J=7,4$ Hz, 4H-bpy), 7,92 (t- $J = 7,4$ Hz, 4H-bpy), 7,96 (d, $J=1,2$ Hz, 2H-bpy-diE), 8,10 (d, $J=7,4$ Hz, 4H-bpy), 8,60 (d, $J=1,2$ Hz, 2H-bpy-diE) (diE = diesteri).
 20

^{13}C -nmr (CDCl_3): 52,9, 59,5, 119,7, 120,4, 123,4, 124,1, 138,2, 139,7, 155,2, 155,7, 158,3, 160,4, 164,9.

25 $\text{C}_{40}\text{H}_{34}\text{N}_8\text{O}_4\text{NaBr} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (865,71):

laskettu (%): C, 55,49; H, 4,89; N, 12,94;

todettu (%): C, 55,44; H, 4,33; N, 13,10.

B. Edeltävän kryptaatin aminolyysi

Edellä saadulle kryptaatille (0,100 g, $1,26 \times 10^{-4}$ mol) suoritetaan aminolyysi lisäämällä pieninä erinä 4 ml etyleenidiamiinia, joka on edeltä käsin tislattu KOH:lla ja kuumennettu 90 °C:seen. Saatua reaktioseosta sekoitetaan vielä 1 tunnin ajan, minkä jälkeen se jäähdytetään ympäristön lämpötilaan. Sen jälkeen etyleenidiamiiniylimäärä poistetaan tyhjässä haihduttamalla ja saadaan öljy.
 30
 25

Tämä öljy lietetään 2 ml:aan kloroformin ja metanolin seosta (2:1), joka sitten poistetaan tyhjässä haihduttamalla. Toistamalla puhdistus 5 kertaa saadaan haluttu kompleksi; saanto on 89 %.

5 **C. Edeltävän kryptaatin muuttaminen vastaavaksi europiumkryptaatiksi**

Noudattaen esimerkin 1 kohdassa H kuvattua suoritustapaa saatiin [(bis-bpy)(bpy-di(amidoetyleeniamiini)]-europiumkryptaatti, jolla on seuraavat spektriominaisuudet:

UV/näkyvä, vedessä: 240 nm; 303 nm (maksimi).

Esimerkki 4

[(bis-bpy)-(bpy-di(amidoetyleeniamiini)]-europiumkryptaatin valmistus (menetelmä A)

15 Kaavan Ib mukainen yhdiste: R' = H.

A. [(bis-bpy)-(bpy-diesteri)]-europiumkryptaatin valmistus

Edeltävän esimerkin kohdassa A saatua natriumkryptaattia (0,10 mmol) liuotetaan 8 ml:aan kloroformia ja liuos lisätään liuokseen, jossa on $\text{EuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$:ta (0,15 mmol) 40 ml:ssa metanolia. Liuosta keitetään sitä samalla sekoittaen ja palautusjäähdyttäen typpisuoja-
20 kunnes natriumkryptaatti on hävinnyt (TLC, aluminiumoksidi, eluentti: metyleenikloridi/metanoli, 90:10). Reaktio-
: 25 aika on noin 48 tuntia. Reaktioseos jäähdytetään ympäristön lämpötilaan ja suodatetaan, jos se on samea. Liuottimet poistetaan pyöröhaihduttimessa haihduttamalla ja jäännös liuotetaan 20 - 25 ml:aan metanolia. Liuokseen lisätään etyylietteriä tipoittain kunnes hyvin kevyt sa-
30 menema säilyy. Europiumkryptaatti kiteytyy täten ympäristön lämpötilassa. Liuottimet poistetaan pipetillä ja kryptaatti kuivataan. Saanto: noin 40 % (ensimmäinen kiteytys). Suodos haihdutetaan kuiviin ja menettely toistetaan.

35 Saadulla yhdisteellä on seuraavat fysiko-kemialli-

set ominaisuudet:

^1H -nmr (D_2O ; t-BuOH): 10,51 (2H, s, CH(bpy-diE),
8,66 (2H, s, CH-bpy-diE), 8,06 (4H, t, CH-bpy), 7,08 (4H,
d, CH-bpy), 6,74 (4H, d, CH-bpy), 4,66 (6H, s, OCH_3), 0,9
5 (8H, s, CH_2 -bpy), -0,78 (4H, s, CH_2 -bpy-diE).

$\text{C}_{40}\text{H}_{34}\text{N}_8\text{O}_4 \cdot \text{EuCl}_3 \cdot \text{NaCl} \cdot 9/2\text{H}_2\text{O}$ (1088,58):

laskettu (%): C, 44,13; H, 3,98; N, 10,29;

todettu (%): C, 43,93; H, 3,79; N, 9,88;

C, 44,06; H, 3,70; N, 10,03.

10 B. Europiumkryptaatin aminolyysi

Edellä saatu europiumkryptaatti (40 mg) lisätään
pieninä erinä 40 ml:aan edeltä käsin KOH:lla tislattua
etyleenidiamiinia. Lämpikuultavaa liuosta sekoitetaan 3
tunnin ajan typpisuojakaasussa ympäristön lämpötilassa.
15 Etyleenidiamiini poistetaan tyhjöissä pyöröhaihduttimessa
haihduttamalla. Jäännös lietetään muutamaan millilitraan
metyleenikloridi/metanolia (2:1) ja liuottimet poistetaan
tyhjöissä haihduttamalla. Menettely toistetaan 5 kertaa
täysin kiinteän yhdisteen saamiseksi. Saatua kryptaattia
20 kuivataan 24 tunnin ajan tyhjöissä siipipumppua käyttäen.

Sulamispiste: 168 - 170 °C.

Tämän europiumkryptaatin ominaisuudet ovat samat
kuin edeltävässä esimerkissä saadun europiumkryptaatin.
Nämä kaksi esimerkkiä osoittavat siten, että alkali-ioni-
: 25 kryptaatti voidaan kompleksoida harvinaiseen maametal-
li-ioniin ennen substituutiota tai sen jälkeen.

Esimerkki 5

[(22) bpy-di(amidoetyleeniamiini)]_n europium- tai
terbiumkryptaatin valmistus

30 Kaavan Ia mukainen yhdiste

A. [(22) bpy-diesteri]-natriumkryptaatin valmistus

Seosta, jossa on 0,114 g ($4,37 \times 10^{-4}$ mol) makro-
sykliä (22) ja 0,460 g ($4,34 \times 10^{-3}$ mol) natriumkarbo-
naattia, keitetään 30 minuutin ajan palautusjäähdyttämällä
35 130 ml:ssa metyyllisyanidia. Sen jälkeen seokseen lisätään

liuos, jossa on 0,200 g ($4,37 \times 10^{-4}$ mol) yhdistettä 1
220 ml:ssa metyyliisyanidia, samalla kiivaasti sekoittaen
60 minuutin aikana. Reaktioseosta keitetään edelleen 15
tunnin ajan sitä samalla sekoittaen ja palautusjäähdyttä-
5 en, minkä jälkeen se jäähdytetään ympäristön lämpötilaan
ja suodatetaan. Liuotin poistetaan tyhjässä pyöröhaihdut-
timessa haihduttamalla. Saatua kiinteä aine liuotetaan me-
tyleenikloridiin ja liuos puhdistetaan suorittamalla kro-
matografia-ajo aluminiumoksidikolonissa (jonka päässä on
10 pieni määrä silikageeliä). Metyleenikloridilla eluoituu
ensin epäpuhtaus. Muodostunut makrobisykli eluoidaan sen
jälkeen metyleenikloridi/metanolilla (98:2). Liuottimet
tyhjässä poistamalla saadaan 0,135 g (61 %) makrobisyk-
liä.

15 **B. [(22) bpy-diesteri]:n europium- tai terbium-
kryptaatin valmistus**

Noudattaen esimerkissä 1H kuvattua suoritustapaa
saatiin vastaavasti [(22) bpy-diesteri]:n europium- ja
terbiumkryptaatit, joilla on seuraavat spektriominaisuu-
20 det:

europiumkryptaatti: UV/näkyvä, metanolissa, 242 nm
ja 324 nm (maksimeja);

terbiumkryptaatti: UV/näkyvä, metanolissa, 242 nm
ja 325 nm (maksimeja).

25 **C. [(22) bpy-di(amidoetyleeniamiini)]-europium-
kryptaatin valmistus**

Edellä saatua europiumkryptaattia ($0,100$ g, $1,43 \times 10^{-4}$ mol) lisätään pieninä erinä 5 ml:aan etyleenidiamiiniä, joka on tislattu KOH:lla ja edeltä päin kuumennettu
30 90 °C:seen. Reaktioseosta sekoitetaan vielä tunnin ajan,
minkä jälkeen se jäähdytetään ympäristön lämpötilaan.
Etyleenidiamiiniylimäärä poistetaan tyhjässä haihdutta-
malla, jolloin saadaan öljy. Tämä öljy lietetään 2 ml:aan
kloroformia, joka sitten poistetaan tyhjässä haihdutta-
35 malla. Toistamalla puhdistus 3 kertaa saadaan 93 mg (90
%) europiumkryptaattia. Tällä kryptaatilla on seuraavat

spektriominaisuudet:

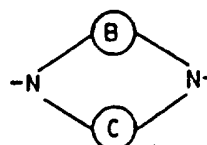
UV/näkyvä, vedessä, 240 ja 315 nm (maksimeja).

Samalla tavalla kohdassa B saadulle terbiumkryptaatille voidaan suorittaa aminolyysi.

5 Esimerkki 6

[(bpy-dikarbometoksi)₃]-natriumkryptaatin valmistus (menetelmä B)

10 Kaava 7: R' = R'' = OCH₃;



on

bis-bipyridiinimakrosykli.

A. 4,4'-dikarbometoksi-6,6'-diatsidometyyli-2,2'-bipyridiinin synteesi

15 Seosta, jossa on 4,4'-dikarbometoksi-6,6'-dibromimetyyli-2,2'-bipyridiiniä (0,50 g, 1,10 x 10⁻³ mol) ja NaN₃:a (1,0 g, 15,4 x 10⁻³ mol), keitetään palautusjäähdyttään 36 tunnin ajan 15 ml:ssa THF:ää. Reaktioseos
 20 jäähdytetään ympäristön lämpötilaan, suodatetaan sellitillä ja haihdutetaan kuiviin. Jäännös liuotetaan kloroformiin ja liuoksella suoritetaan kromatografia-ajo sili-kageelissä eluoiden kloroformilla.

Liuotin haihduttamalla saadaan 0,40 g (95 %) haluttua yhdistettä, jolla on seuraavat fysiko-kemialliset
 : 25 ominaisuudet:

Sp. = 168 - 170 °C.

¹H-nmr (CDCl₃): 4,02 (s, 6H, COOCH₃), 4,63 (s, 4H, CH₂-H₃), 7,94 (d, J=1,3 Hz, 2H), 8,96 (d, J=1,3 Hz, 2H);

¹³C-nmr (CDCl₃): 52,7, 55,1, 120,0, 121,5, 139,7,

30 156,0, 156,8, 165,3;

IR (KBr): 1715 cm⁻¹ (esteri), 2090 cm⁻¹ (atsidi).

MS: 383 ((MH)⁺).

C₆H₁₄N₈O₄ (382,34):

laskettu (%): C, 50,27; H, 3,69; N, 29,31;

35 todettu (%): C, 50,37; H, 3,51; N, 27,69.

B. 4,4'-dikarbometoksi-6,6'-diaminometyyli-2,2'-bipyridiinin synteesi (yhdiste 5)

Seosta, jossa on kohdan A mukaan saatua yhdistettä (0,126 g, $3,30 \times 10^{-4}$ mol) ja 12,6 mg 10-%:sta Pd/C-katalyyttiä 38 ml:ssa metyleenikloridi/metanolia (2:1), sekoitetaan ympäristön lämpötilassa vetyilmakehässä 12 tunnin ajan.

Reaktioseos suodatetaan seliitillä, minkä jälkeen liuottimet haihduuttamalla saadaan 0,100 g (92 %) haluttua yhdistettä, jota käytetään puhdistamatta seuraavassa vaiheessa.

C. [bpy-dikarbometoksi]₃-natriumkryptaatin synteesi (yhdiste 7)

Seosta, jossa on yhdistettä 6 ($R' = OCH_3$; $X = Br$) (0,280 g, $6,11 \times 10^{-4}$ mol) ja natriumkarbonaattia (0,65 g, $6,13 \times 10^{-3}$ mol), keitetään palautusjäähdyttäen 500 ml:ssa metyyliisyanidia. Sen jälkeen reaktioseokseen lisätään 0,100 g ($3,03 \times 10^{-4}$ mol) yhdistettä 5 ja reaktioseosta keitetään edelleen sitä samalla sekoittaen ja palautusjäähdyttäen 48 tunnin ajan. Reaktioseos jäähdytetään ympäristön lämpötilaan ja suodatetaan, minkä jälkeen suodoksesta poistetaan liuotin tyhjässä haihduuttamalla. Jäännös lietetään kloroformiin ja lietteellä suoritetaan kromatografia-ajo aluminiumoksidikolonissa (jonka päässä on vähän silikageeliä) kloroformi/metanolilla (98:2) eluoiden. Liuottimet haihduuttamalla saadaan 0,132 g (40 %) makrobisykliä 7 ($R'' = R' = OCH_3$).

Sp. > 250 °C.

¹H-nmr (CDCl₃): 4,02 (s, 18H, COOCH₃), 4,08 (s, 12H, CH₂), 7,96 (d, J=1,2 Hz, 6H), 8,49 (d, J=1,2 Hz, 6H);

¹³C-nmr (CDCl₃): 53,2, 59,2, 120,0, 123,8, 139,9, 155,6, 159,9, 164,8.

C₄₈H₄₂N₈O₁₂·NaBr·3H₂O (1079,84):

laskettu (%): C, 53,39; H, 4,48; N, 10,38;

todettu (%): C, 53,40; H, 4,40; N, 9,75.

Edellä saadulle kryptaatile voidaan suorittaa aminolyysi etyleenidiamiinia käyttäen edeltävissä esimerkeissä kuvattua suoritustapaa noudattaen. Yleensä saadaan ryhmällä CO-NH-CH₂-CH₂-NH₂ mono-, di-heksasubstituoitujen kryptaattien seos. Nämä yhdisteet voidaan erottaa tavannoimaisiin keinoin.

Esimerkki 7

[bis(bpy-dikarboksibutoksi), bpy-diamidoetyleeniamiini]-europiumkryptaatin valmistus

Kaava Ib: R' = t-Bu (tert-butyylili tai Bu^t)

A. [bis(bpy-dikarboksibutoksi), bpy-dikarboksi-metoksi]-natriumkryptaatin valmistus

Esimerkissä 6 kuvattua suoritustapaa noudattaen ja käyttäen tämä esimerkin kohdassa B saatua yhdistettä 5 sekä yhdistettä 6 (R' = COO(t-C₄H₉); X = Br) saatiin kaavan 7 mukainen natriumkryptaatti (R' = COO(t-C₄H₉); R'' = COOCH₃), jolla on seuraavat fysiko-kemialliset ominaisuudet:

Sp. > 220 °C.

¹H-nmr (CDCl₃): 1,60 (s, 36H, COOBu^t), 3,99, 4,02, 4,06, (3s, 18H, CH₂-bpy-di-COOMe + CH₂-bpy-di-COO-Bu^t, + -COOCH₃), 7,81 (s, 4H, bpy-di-COO-Bu^t), 7,95 (s, 2H, bpy-di-COO-Me), 8,36 (s, 4H, bpy-di-COO-Bu^t), 8,45 (s, 2H, bpy-di-COO-Me).

¹³C-nmr (CDCl₃): 28,0, 53,1, 59,1, 83,4, 119,8, 119,9, 123,4, 123,7, 139,8, 141,7;

C₆₀H₆₆N₈O₁₂·NaBr·3H₂O (1248,18):

laskettu (%): C, 57,73; H, 5,81; N, 8,98;

30 todettu (%): C, 57,99; H, 5,31; N, 9,03.

Tämä natriumkryptaatti muutettiin sitten vastaavaksi europiumkryptaattiksi edellä kuvatun suoritustavan mukaan.

Tälle suoritettiin sitten aminolyysi etyleenidi-amiinia käyttäen.

Yhden suoritusmuodon mukaan edeltävälle yhdisteelle 7 voidaan ensin suorittaa aminolyysi, minkä jälkeen saatu natriumkryptaatti muutetaan vastaavaksi europiumkryptaatiksi aiemmin kuvattuja suoritustapoja noudattaen.

5 Yhdisteiden käyttö fluoresoivina merkkeinä

Kuten edellä on mainittu, keksinnön mukaiset yhdisteet soveltuvat biologisten aineiden leimaamiseen, joka suoritetaan kytkemällä keksinnön mukainen yhdiste kovalentilla sidoksella mitattavaan tai todettavaan biologiseen aineeseen. Tämä kytkeminen voidaan suorittaa tällä alalla käytettyjen tavanomaisten kytkemismenetelmien mukaan, kuten esimerkiksi menetelmillä, joissa käytetään SMCC/SPDP:tä tai karbodi-imidiä (katso julkaisu "Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology - Practice and Theory on Enzyme- and Immunoassays", 10 P. Tijssen, Elsevier, 1. painos, 1985).

Keksinnön mukaiset kryptaatit soveltuvat fluoresoiviksi merkeiksi biologisten aineiden kaiken tyyppisiin määritys- tai toteamismenetelmiin ja erityisesti ns. kilpailu- tai ylimäärämittausten menetelmiin, homogeenisessa faasissa tai heterogeenisessä faasissa, jotka menetelmät ovat alan ammattilaiselle tuttuja ja joita kuvaa erityisesti Landon, Ann. Clin. Biochem. 18 (1981) 253, ja Soini, Clin. Chemi. 25 (1979) 353. Niitä voidaan samoin 20 käyttää homogeenisessä toteamis- ja/tai määritysmenetelmässä, joka perustuu luminointiin ja jota kuvataan PCT-hakemusjulkaisussa WO 87/00927.

Todettavina tai määritettävänä biologisina aineina tulevat kyseeseen esimerkiksi vasta-aineet, antigeenit, 30 toksiinit, entsyymit, proteiinit, hormonit, hormonireseptorit, steroidit, avidiini, biotiini, streptavidiini, mikro-organismit, hapteenit, nukleiinihapot, DNA- ja RNA-fragmentit, lipidit, sokerit jne. Esimerkkejä tällaisista aineista mainitaan EP-hakemusjulkaisussa 17 908, joka sisällytetään tähän selitykseen viitteeksi. 35

Keksinnön mukaisten yhdisteiden käyttöä fluoresoivina merkkeinä havainnollistetaan seuraavilla viidellä esimerkillä.

5 Seuraavissa kokeissa A, D ja E käytettiin reagensseja SPDP ja sulfo-SMCC, jotka ovat vastaavasti: "N-sukkinimidyyli-3-(2-pyridyyli)propionaatti" ja "sulfosukkinimidyyli-4-(N-maleimidometyyli)sykloheksaani-1-karboksylaatti".

10 Koe A: Vasta-aine-kryptaattikonjugaatin muodostus SMCC/SPDP:tä käyttäen

1) **Esimerkin 3 mukaan saadun europiumkryptaatin aktivointi**

15 500 mikrolitraan liuosta, jossa on kryptaattia 1,5 mg/ml 20 mM fosfaattipuskurissa, pH 7, lisätään 50 mikrolitraa liuosta, jossa on sulfo-SMCC:tä 13,1 mg/ml samassa puskurissa.

20 Sitten seosta inkuboidaan 30 minuutin ajan ympäristön lämpötilassa, minkä jälkeen sitä sekoitetaan vorteks-sekoittajalla 5 minuutin ajan. Liuos sentrifugoidaan sakan poistamiseksi. Suodos puhdistetaan käyttämällä se Pharmacia Mono Q -ioninvaihtokolonnissa, jolloin eluutiogradientti muodostettiin seuraavista:

puskuri A: 20 mM fosfaatti, pH 7 + 10 % DMF

puskuri B: 20 mM fosfaatti, pH 7 + 10 % DMF + 1 M

25 NaCl.

Kryptaatti todetaan mittaamalla sen absorbanssi 307 nm:n aallonpituudella ($\epsilon = 25\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ 307 nm:ssä). Aktivoitu kryptaatti eluoituu kuolleessa tilavuudessa. Sulfo-SMCC-ylimäärä eluoituu gradientissa.

30 2) **Vasta-aineen aktivointi**

35 Käytetty monoklonaalinen vasta-aine E, on prolaktiinin vastainen vasta-aine, jota sisältävät prolaktiinin immunoradiometrisiin mittauksiin tarkoitetut pakkaukset, joita valmistaa Oris Industrie ja jotka tunnetaan nimellä "Elsa Prol".

1,2 ml:aan liuosta, jossa on vasta-ainetta E₁ 14,8 mg/ml 50 mM:n fosfaattipuskurissa, pH 7,1, joka käsittää pitoisuuden 150 mM NaCl, lisätään 30 mikrolitraa 30 mM SPDP-liuosta vedettömässä etanolissa. Seosta inkuboidaan 5 30 minuutin ajan ympäristön lämpötilassa sitä samalla sekoittaen. Liuos käytetään Pharmacia G25 -geelikolonnissa, jota on tasapainotettu samalla fosfaattipuskurilla ($\epsilon = 210\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ 280 nm:ssä). Haluttu fraktio eluoituu kuolleessa tilavuudessa. Siihen lisätään 60 mikrolitraa 10 400 mM DTT- (ditiotreitoli-) liuosta fosfaattipuskurissa.

Liuosta inkuboidaan 15 minuutin ajan ympäristön lämpötilassa sitä samalla sekoittaen, minkä jälkeen se panostetaan fosfaattipuskurilla tasapainotettuun G25-koloniin, josta otetaan talteen kuolleessa tilavuudessa 15 eluoituva fraktio.

3) Aktivoidun vasta-aineen kytkeminen aktivoituun kryptaattiin

60 mikrolitraan liuosta, jossa on aktivoitua vasta-ainetta 2,6 mg/ml fosfaattipuskurissa, lisätään 50 20 mikrolitraa liuosta, jossa on kryptaattia 200 mikromol/litra.

Liuosta inkuboidaan 12 tunnin ajan ympäristön lämpötilassa, minkä jälkeen se sentrifugoidaan. Supernatantti dialysoidaan 50 mM:n fosfaattipuskuria, pH 7,4, vastaan. 25

Koe B: Vasta-aine-kryptaattikonjugaatin muodostaminen karbodi-imidiä käyttäen

1) **Vasta-aineen sukkinilointi**

83 mikrolitraa liuosta, jossa on meripihkahappoanhydridiä 50 mg/ml seoksessa, jossa on 1/3 DMSO:ta ja 2/3 30 100 mM:n boraattiliuosta, pH 9, lisätään 3 eränä 440 mikrolitraan liuosta, jossa on vasta-ainetta E₁ 9,4 mg/ml 100 mM:n boraattiliuoksessa, pH 9, ja jonka sisältävä astia on upotettu sulaviin jäihin.

35 pH pidetään 9:ssä lisäämällä natriumhydroksidia,

ja seoksen annetaan reagoida 30 minuutin ajan 0 °C:ssa.

2) Puhdistaminen

Puhdistus suoritetaan käyttäen korkeapainekromatografiaa TSK 3000 SW -geelisuodatuskolonnissa, jolloin
5 eluuttina käytetään 50 mM:n fosfaattipuskuria, pH 7,4.
Virtausnopeus on 1 ml/min.

Sukkiniloitu vasta-aine otetaan talteen 3 ml:n fraktiossa, jota konsentroidaan 370 mikrolitran tilavuuden saamiseksi.

10 3) Sukkiniloidun vasta-aineen ja kryptaatin kytkeminen toisiinsa

Liuos 1: sekoitetaan 25,5 mg karbodi-imidiä 1335 mikrolitraan 50 mM:n fosfaattipuskuria, pH 7,4;

15 liuos 2: 50 mg/ml sulfo-N-hydroksisukkinimidiä samassa puskurissa (14,7 mg 222,7 mikrolitrassa);

liuos 3: 0,96 mg/ml esimerkin 3 mukaista kryptaattia samassa puskurissa.

Tunnin ajan ympäristön lämpötilassa annetaan reagoida seoksen, jossa on:

20 175 mikrolitraa sukkiniloidun vasta-aineen liuosta
480 mikrolitraa liuosta 3
72,5 mikrolitraa liuosta 1
10 mikrolitraa liuosta 2

25 Perusteellisen dialysoinnin jälkeen 50 mM:n fosfaattipuskuria, pH 7,4, vastaan tuotetta konsentroidaan Amicon-suppilossa, jolloin saadaan konjugaattiliuosta, jossa pitoisuus on 0,86 mg/ml.

Tuote jäädytetään kyseisessä puskurissa, johon on lisätty 1 mg/ml ihmisen seerumialbumiinia (HSA).

30 Tulokset: Prolaktiinin mitta

Käytetään Elsa Prol -prolaktiinimittauspakkauksen reagensseja.

Kuhunkin putkeen, joka sisältää Elsa-pakkauksen kiinteää faasia, lisätään:

100 mikrolitraa standardiliuosta

300 mikrolitraa E₁-kryptaattikonjugaattiliuosta, joka on saatu kokeen A tai B mukaan ja joka on 50 mM:n fosfaattipuskurissa, pH 7,4, joka sisältää 1 mg/ml HSA:ta.

Putkien sisältöä inkuboidaan 3 tunnin ajan 37 °C:ssa. Kiinteä faasi pestään 2 x 3 ml:lla vettä. Putkiin lisätään 400 mikrolitraa puskuria, joka käsittää pitoisuuden 5 mM natriumdodekyylisulfaattia (SDS). 300 mikrolitraa tätä liuosta siirretään fluoresenssin mittausta silmälläpitäen Arcus LKB -laitteeseen.

Saadut tulokset on esitetty oheisessa kuviossa 1. Tässä kuviossa ordinaataksi on merkitty fluoresointi-intensiteetti ja abskissana on prolaktiinipitoisuus mikroU/ml.

Nämä tulokset osoittavat, että keksinnön mukaiset kryptaatit soveltuvat fluoresoiviksi merkeiksi immunologiseen mittaukseen.

Tämän jälkeen esitetyssä kokeessa C esitellään keksinnön mukaisten kryptaattien käyttöä PCT-hakemusjulkaisun WO 87/00927 mukaisessa homogeenisessä menetelmässä.

Koe C: Prolaktiinin mittaaminen

I. Prolaktiinin homogeeninen mittaaminen

A. Jodin kiinnittäminen vasta-aineeseen

Monoklonaalinen anti-prolaktiini-G₂-vasta-aine leimataan Woodin reagenssilla [joka kuvataan julkaisussa Anal. Biochem. 69 (1975) 339 - 349 esitetyssä synteesissä].

2,93 mg Woodin reagenssia liuotetaan 40 mikrolitraan 0,5 N natriumhydroksidiliuosta. Liuokseen lisätään 400 mikrolitraa 200 mM:n karbonaattipuskuria, pH 9,3. Tähän liuokseen lisätään 200 mikrolitraa liuosta, jossa on

vasta-ainetta G₂ 10 mg/ml 100 mM:n karbonaattipuskurissa, pH 9,3, ja seosta inkuboidaan 17 tunnin ajan 30 °C:ssa. Liuos puhdistetaan Pharmacia PD10 -kolonnissa eluoiden 100 mM:n karbonaattipuskurilla, pH 9,3.

5 Kuollessa tilavuudessa eluoituneet fraktiot otetaan talteen; konjugaatilla on tunnusomainen optisen tiheyden arvojen välinen suhe 320 ja 280 nm:ssä:

$$\frac{Do_{320}}{Do_{280}} = \text{noin } 1,4 - 1,5$$

Do 280

10 Konjugaatin pitoisuus arvioidaan ottaen huomioon, että 90 % vasta-aineesta saadaan talteen. Konjugaattiliuos jaetaan eriksi, joita säilytetään -20 °C:ssa.

B. Prolaktiinin mittaaminen (käyrä A)

15 Käytetään prolaktiinistandardiliuoksia, joissa pitoisuus on 0, 15, 30, 60 ja 150 ng/ml. Mittaus suoritetaan käyttäen Eflabin 12 kuopan mittausliuskoja kataloginro 9 602 107.

Kuoppiin lisätään peräjälkeen:

100 mikrolitraa standardiliuosta

20 100 mikrolitraa vasta-aine-G₂-Wood-liuosta, jonka pitoisuus on 5 mikrogrammaa/ml

100 mikrolitraa kokeessa A saatua konjugaatti-E₁-liuosta, jonka pitoisuus on 0,375 mikrogrammaa/ml.

25 Seosta inkuboidaan 15 minuutin ajan ympäristön lämpötilassa, minkä jälkeen tulokset luetaan Arcus-laitteessa ja piirretään standardikuvaaja esittämällä ΔF -arvot standardiarvojen funktiona (kuvio 2), jolloin

$$\Delta F = \frac{\text{standardille mitattu fluoresenssi} - \text{O-kokeen fluoresenssi}}{\text{O-kokeen fluoresenssi}}$$

30 I. Prolaktiinin mittaaminen radioimmunometrisesti (kuvaaja B)

Käytetään Elsa Prol -pakkausta (valmistaja Oris).

Elsa-putkeen mitataan:

300 mikrolitraa radioaktiivista leimaliuosta

35 100 mikrolitraa standardiliuosta.

Sekoituksen jälkeen inkuboidaan 3 tunnin ajan 37 °C:ssa, minkä jälkeen putket pestään 2 kertaa vedellä ja niiden radioaktiivisuus mitataan laskijalla.

5 Muodostetaan arvo B/T kullekin standardille (kuvio 2), jolloin

B = standardille mitattu radioaktiivisuus

T = 300 mikrolitralla radioaktiivista leimaliuosta mitattu radioaktiivisuus.

10 Saadut tulokset (katso kuvio 2) osoittavat, että keksinnön mukaiset kryptaatit soveltuvat merkeiksi PCT-hakemusjulkaisun WO 87/00927 mukaiseen homogeeniseen menetelmään. Toisaalta voidaan todeta, että keksinnön mukaisten kryptaattien ansiosta tämä homogeeninen menetelmä on erityisen edullinen verrattuna mittausmenetelmään, jossa käytetään radioaktiivista ainesosaa, joka edellyttää huomattavasti pidempää inkubointiaikaa, pesuvaiheita ja radioaktiivisten aineiden käsittelyä.

Koe D: DNA-kryptaatti-konjugaatin muodostus SMCC/-SPDP:tä käyttäen

20 1. DNA:n funktionalisointi DNA-NH₂:ksi

Modifioitu nukleotidi, 5-amino(12)dUTP (valmistajan Calbiochem kaupallisesti saatavana oleva tuote) liitetään DNA:han nick-translatoimalla Calbiochem-yhtiön suositteloman suoritustavan mukaan. Sitten aminoitua DNA:ta puhdistetaan pesemällä kolme kertaa peräkkäin Centricon-suodattimella (Amicon-yhtiön markkinoima tuote) 10 mM:n fosfaattipuskuria, pH 7,4, käyttäen.

2. DNA-NH₂:n kytkeminen SPDP:hen

30 55 mikrolitraa liuosta, jossa on 9 mikrogrammaa DNA-NH₂:ta (mitattuna UV:llä) 0,1 M boraattipuskurissa, pH 9,0, lisätään 5 mikrolitraan 20 mM:n SPDP-liuosta. Reaktio annetaan kestää 4 tuntia 45 °C:ssa. Reagoimatta jäänyt SPDP poistetaan pesemällä kolmeen kertaan Centricon-suodattimella 50 mM:n fosfaattipuskuria, pH 7,0, käyttäen.

3. Suojaryhmän poistaminen DNA-SPDP:stä ja kytkeminen kryptaattiin

90 mikrolitraan liuosta, jossa on 6 mikrogrammaa (arvioitu optisen tiheyden mittauksella) DNA-SPDP:tä 50 mM:n fosfaattipuskurissa, pH 7,0, lisätään juuri ennen kytkemistä 10 mikrolitraa 10 mM:n DTT-liuosta samassa puskurissa. Suojaryhmän poisto kestää 20 minuuttia ympäristön lämpötilassa. Tämän jälkeen suoritettavaa kytkemistä inhiboiva DTT poistetaan pesemällä kolmeen kertaan Centricon-suodattimella edeltävää puskuria käyttäen. DNA-SH-liuos konsentroidaan Centricon-suodattimella 90 mikrolitran lopputilavuuteen.

90 mikrolitraa DNA-SH-liuosta saatetaan kosketuksiin 50 mikrolitran kanssa esimerkin 3 mukaista europium-kryptaattiliuosta, jossa kryptaatti on aktivoitu SMCC:llä kokeen A kohdan 1 mukaan (14 mM), 20 mM:n fosfaattipuskurissa, pH 7,0, joka sisältää 10 % DMF:ää. Kytkentä suoritetaan 30 °C:ssa 1 tunnin aikana. DNA-kryptaattikonjugaattia puhdistetaan saostamalla kolmeen kertaan peräjälkeen etanolista. Kytkentäaste arvioidaan mittaamalla absorbanssi 260 nm:ssä ja fluoresenssi 620 nm:ssä.

4. Täten kryptaattiin kytkettyä DNA-koetinta voidaan käyttää komplementoivan nukleinihapposekvenssin toteamiseksi ja mittaamiseksi jonkin menettelytavoista mukaan, joita kuvaavat J. Matthews et al. julkaisussa Analytical Biochemistry 169 (1988) 1 - 25, artikkelissa otsikolla "Analytical Strategies for the Use of DNA-Probes" (suom. "Analyyttisiä menettelytapoja DNA-koettimien käyttämiseksi").

Koe E: Kovalentin streptavidini-kryptaattikonjugaatin muodostaminen

1. Streptavidinin kytkeminen SPDP:hen

20 mikrolitraa 20 mM:n SPDP-liuosta 0,5 M:n karbonaattipuskurissa, pH 9,5, lisätään 180 mikrolitraan liuosta, joka sisältää 1 mg streptavidiniä samassa puskurissa.

Reaktion annetaan kestää tunnin ajan ympäristön lämpötilassa. SPDP-ylimäärä poistetaan pesemällä neljä kertaa peräjälkeen Centricon-suodattimella 0,1 M:n fosfaattipuskuria, pH 7,4, käyttäen.

5 **2. Suojaryhmän poistaminen streptavidiini-SPDP:stä ja kytkeminen kryptaattiin**

360 mikrolitraan liuosta, jossa on (noin 1 mg) streptavidiini-SPDP:tä 0,1 M:n fosfaattipuskurissa, pH 7,4, lisätään 40 mikrolitraa 100 mM:n DTT-liuosta samassa pusku-
10 rissa.

Reaktion annetaan kestää 15 minuuttia ympäristön lämpötilassa reaktioseosta samalla sekoittaen, minkä jäl-
keen seos pestään kolme kertaa Centricon-suodattimella edeltävää puskuria käyttäen.

15 Streptavidiini-SH:ta (noin 1 mg) kytketään 625 mikrolitrassa 0,1 M:n fosfaattipuskuria, pH 7,4, 43 mikro-
grammaan esimerkin 3 mukaista europiumkryptaattia, joka on aktivoitu SMCC:llä kokeen A kohdan 1 mukaan ja joka on 175
20 mikrolitrassa 20 mM:n fosfaattipuskuria, pH 7, joka sisältää 10 % DMF:ää. Kytkentäreaktion annetaan kestää 2,5
tuntia ympäristön lämpötilassa. Reagoimatta jäänyt kryptaatti-SMCC poistetaan pesemällä neljä kertaa Centricon-
suodattimella 0,1 M:n fosfaattipuskuria, pH 7,4, käyttäen.

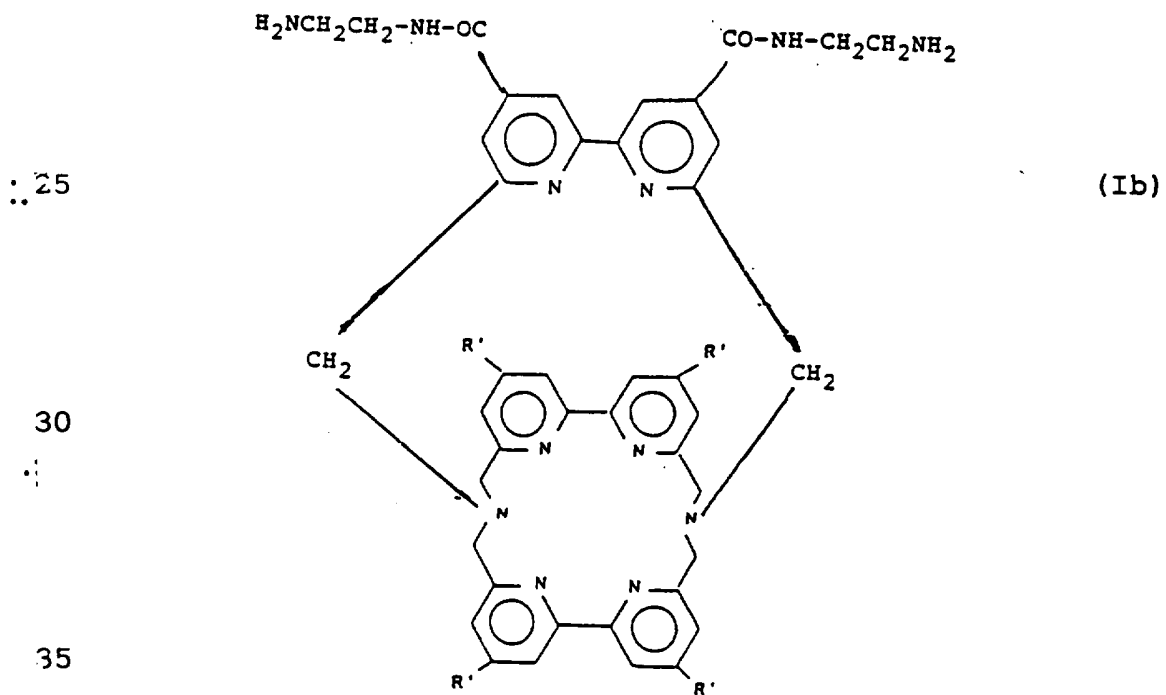
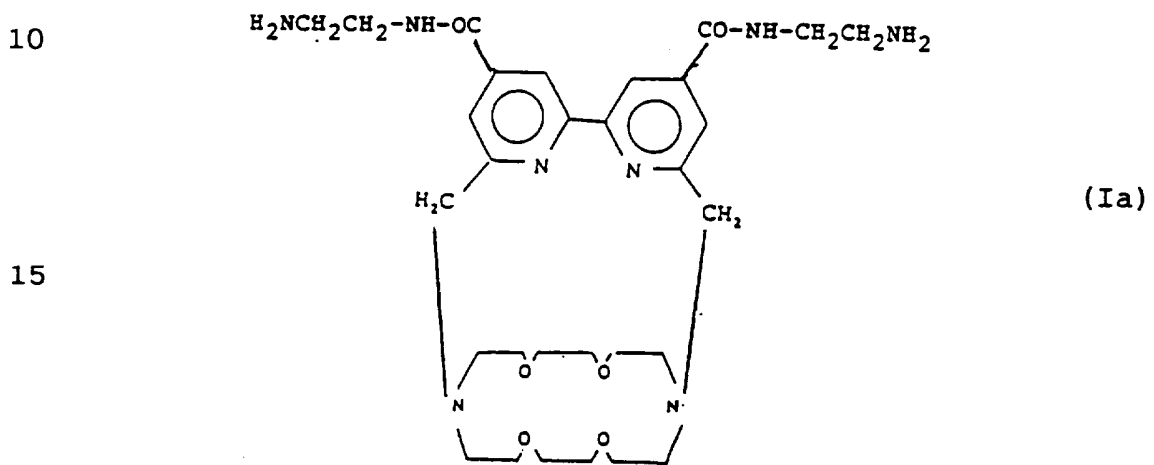
25 Kytkentäaste arvioidaan mittaamalla absorbanssi 280 nm:ssä ja fluoresenssi 620 nm:ssä.

Saatu konjugaatti puhdistetaan käyttäen geelisuodatusta TSKG3000 SW -kolonnissa ja 1 M:n NaCl-puskuria, joka sisältää 0,1 % TFA:ta. Toteaminen suoritetaan mittaamalla absorbanssi 280 nm:ssä ja fluoresenssi 620 nm:ssä.

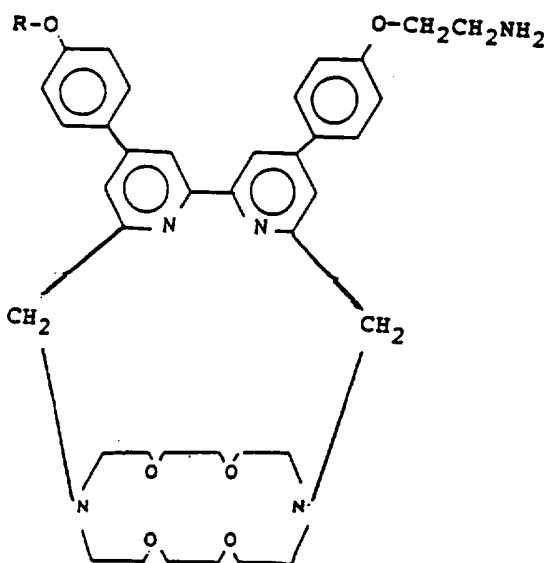
30 **3. Tällaista streptavidiini-kryptaattikonjugaattia voidaan käyttää fluoresoivana merkinä biotinyloiduille molekyyille (nukleinihapot, oligonukleotidit, vasta-aineet, antigeenit, haptteenit tai muut biologiset aineet), jotka tunnistavat biomolekyylijä, joille niillä on voimakas**
35 **affiniteetti tavanomaisen mittaus- tai toteamismenetelmän mukaisessa seoksessa.**

Patenttivaatimukset

1. Harvinaisten maametallien 2,2-bispyridyylikryp-
 taatit, jotka koostuvat vähintään yhdestä harvinaisen maa-
 metallin suolasta, joka on valittu ryhmästä nitraatti,
 5 kloridi, asetaatti ja trifluoriasetaatti ja joka on komp-
 leksoitu substituoituun bispyridiinijohdannaiseen, jolla on
 kaava Ia, Ib, IIa tai IIb



5

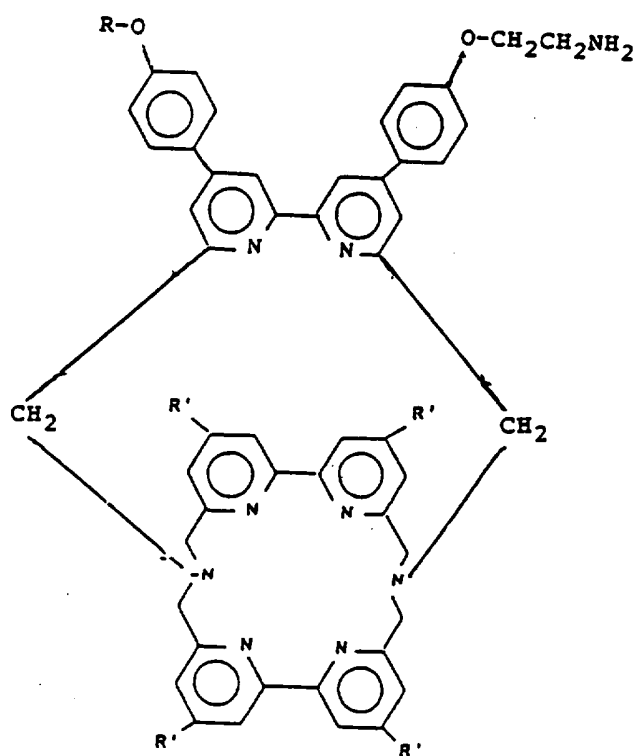


(IIa)

10

15

20



(IIb)

25

30

35

...

joissa

R on metyyliryhmä tai ryhmä $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$;

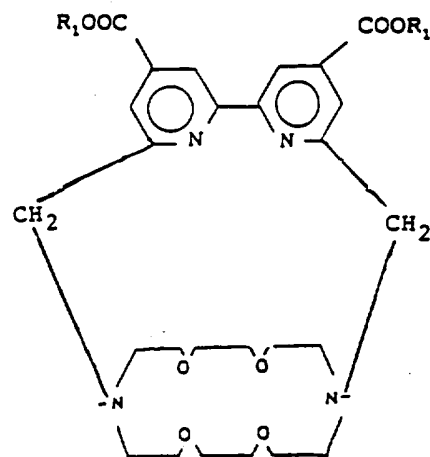
R' on vety tai ryhmä $-\text{COOR}''$, jossa R'' on C₁-C₁₀-alkyyliryhmä ja edullisesti metyyli-, etyyli- tai tert-bu-
5 tyyliryhmä.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukaiset kryptaatit, joiden kaava on IIa tai IIb, jossa R on metyyliryhmä.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukaiset kryptaatit, joiden kaava on Ib, jossa R' on ryhmä $-\text{COOR}''$, jossa R'' on
10 määritelty kuten patenttivaatimuksessa 1.

4. Menetelmä patenttivaatimuksen 1 mukaisten kryptaattien valmistamiseksi, joiden kaava on Ia tai Ib, t u n n e t t u siitä, että yhdisteelle, jonka kaava on
15 3a tai 3b

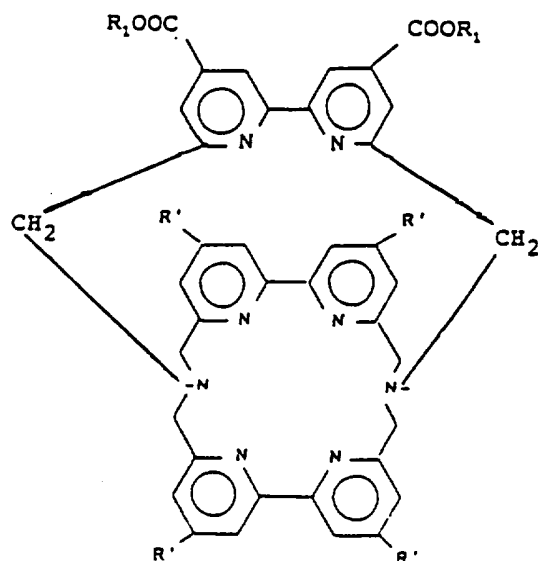
15



3a

20

25



3b

30

35

jossa R_1 on C_{1-10} -alkyyli-ryhmä, suoritetaan aminolyysi saattamalla se reagoimaan amiinin kanssa, jonka kaava on $NH_2-CH_2CH_2-NH_2$, joka reaktio suoritetaan typpisuo-
 ympäristön lämpötilassa, minkä jälkeen saatu yhdiste muu-
 tetaan ioninvaihdolla harvinaisen maametallin kryptaati-
 si.

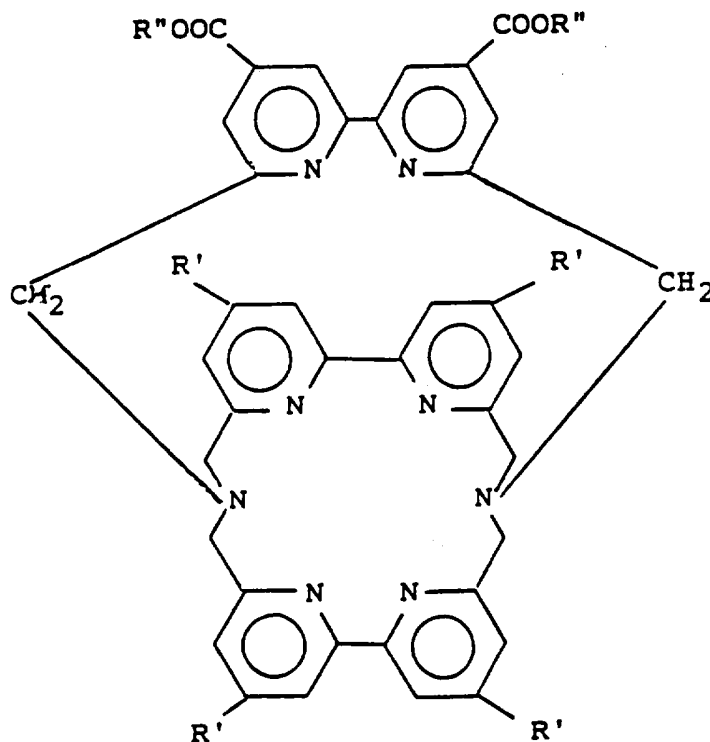
5. Menetelmä patenttivaatimuksen 1 mukaisten kryptaattien valmistamiseksi, joilla on kaava Ib, t u n -
 n e t t u siitä, että yhdisteelle, jolla on kaava 7

10

15

20

25



(7)

30 jossa R' ja R'' merkitsevät samaa kuin patenttivaatimukses-
 sa 1, suoritetaan aminolyysi saattamalla se reagoimaan
 amiinin kanssa, jonka kaava on $NH_2-CH_2CH_2-NH_2$, joka reaktio
 suoritetaan typpisuo-
 jakeasussa huoneen lämpötilassa, minkä
 jälkeen saatu yhdiste muutetaan ioninvaihdolla harvinaisen
 maametallin kryptaati-
 ksi.

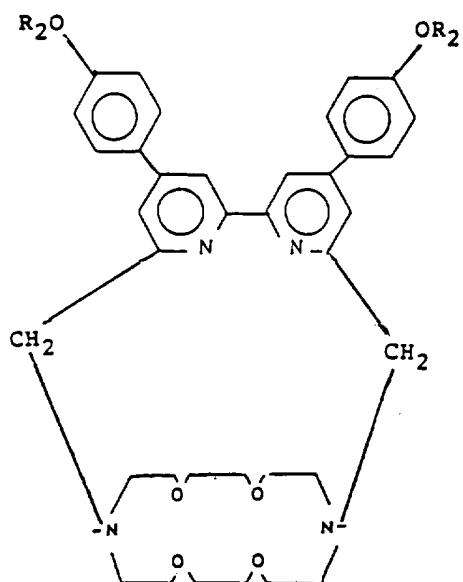
35

6. Menetelmä patenttivaatimuksen 1 mukaisten kryptaattien valmistamiseksi, joilla on kaava IIa tai IIb, tunnettu siitä, että yhdiste, jonka kaava on 10a tai 10b

5

10

15



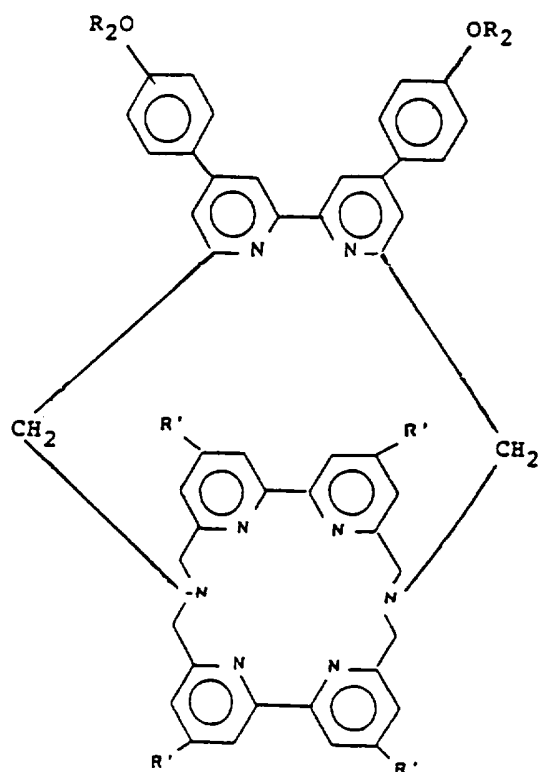
10a

20

25

30

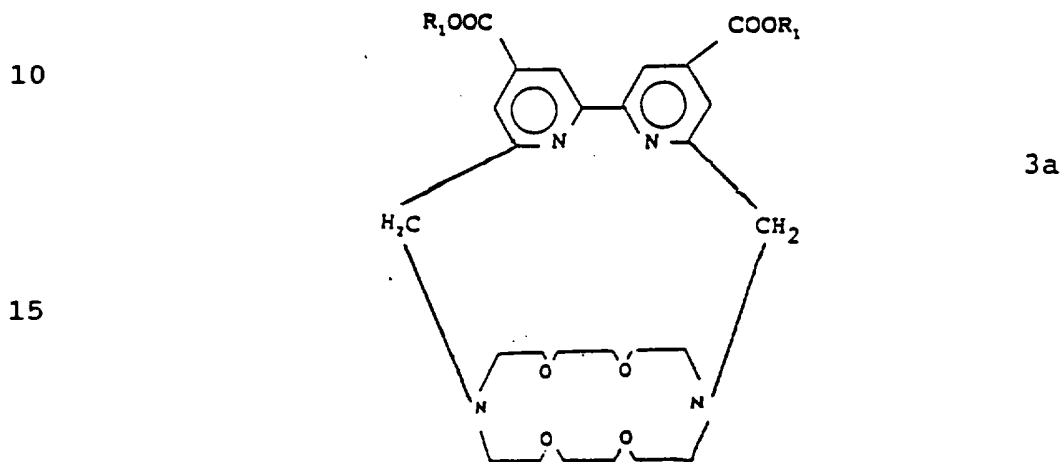
35



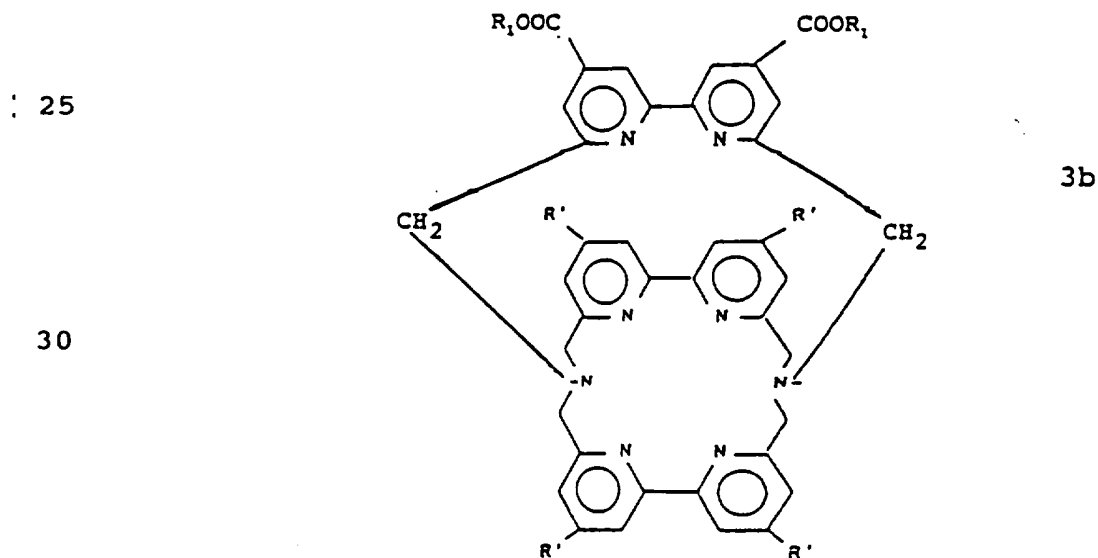
10b

jossa R_2 on H tai CH_3 , substituoidaan halogenoidun yhdis-
teen kanssa, jonka kaava on $X-CH_2CH_2-Z'$, jossa Z' tarkoittaa
ryhmää NH_2 tai tämän prekursoria, ja on X on halogeni-
di-ioni, minkä jälkeen ryhmä Z' haluttaessa muutetaan ryh-
mäksi NH_2 , ja saatu yhdiste muutetaan ioninvaihdolla harvi-
naisen maametallin kryptaateiksi.

7. Makropolysykliset kompleksit, joiden kaava on

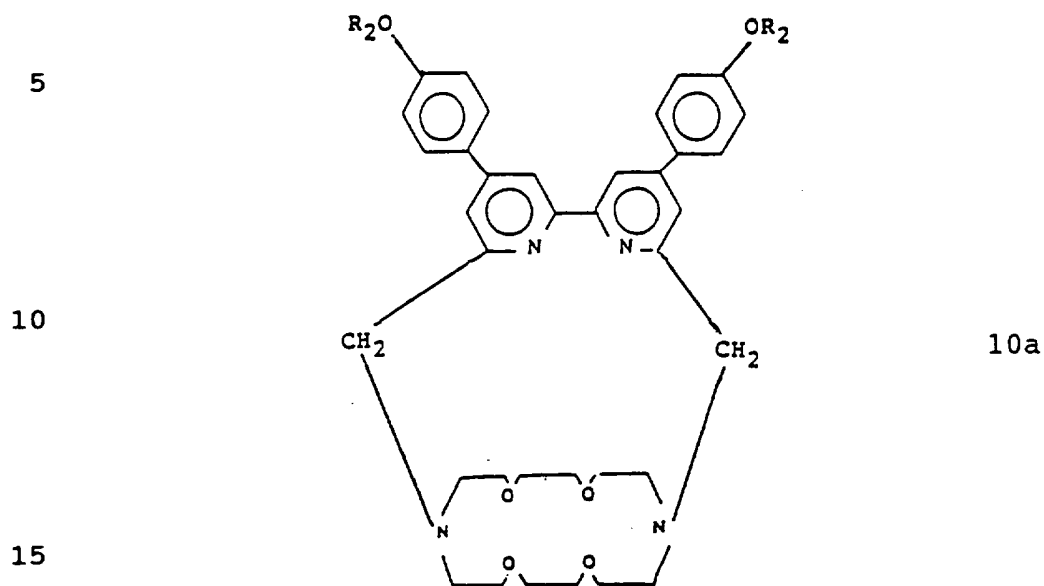


20 tai

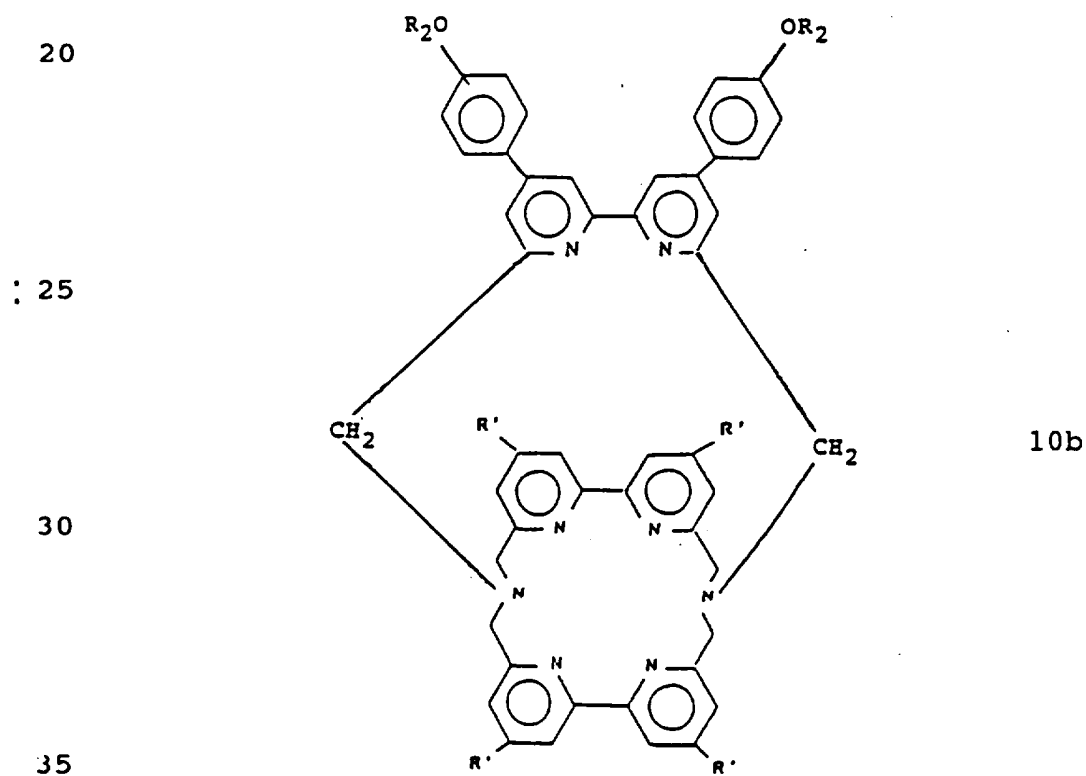


jossa R_1 on määritelty kuten patenttivaatimuksessa 4.

8. Yhdisteet, joiden kaava on



tai



jossa R_2 on H tai CH_3 .

9. Patenttivaatimuksen 7 tai 8 mukaiset välituotteet, jotka ovat vapaiden kryptanttien muodossa.

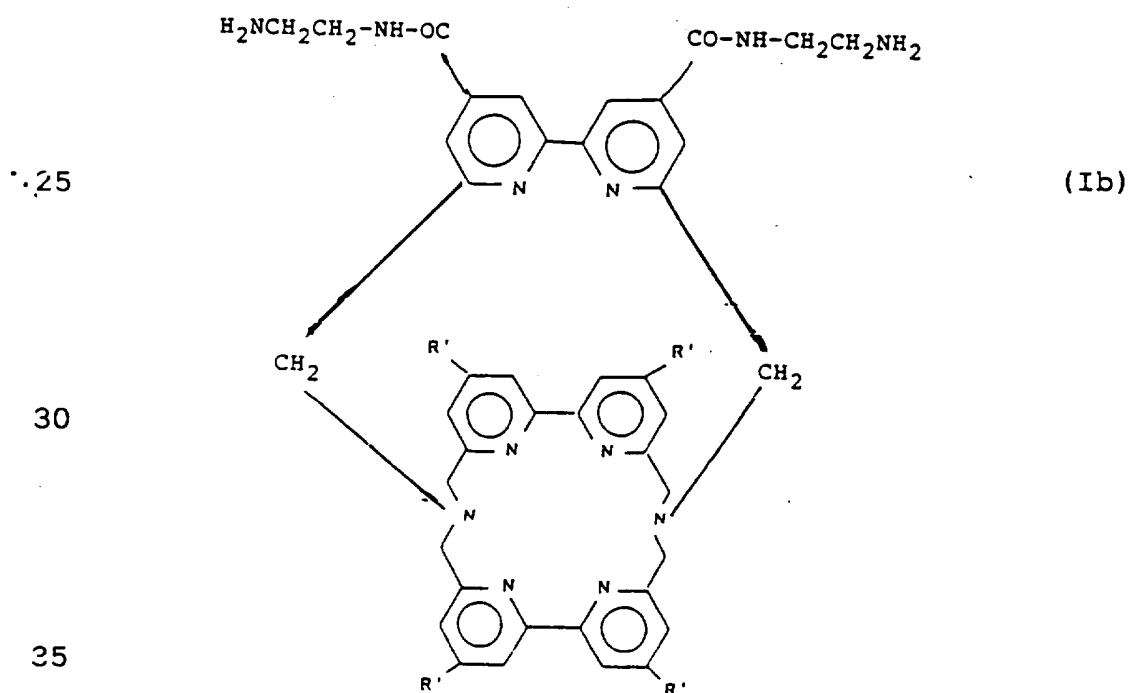
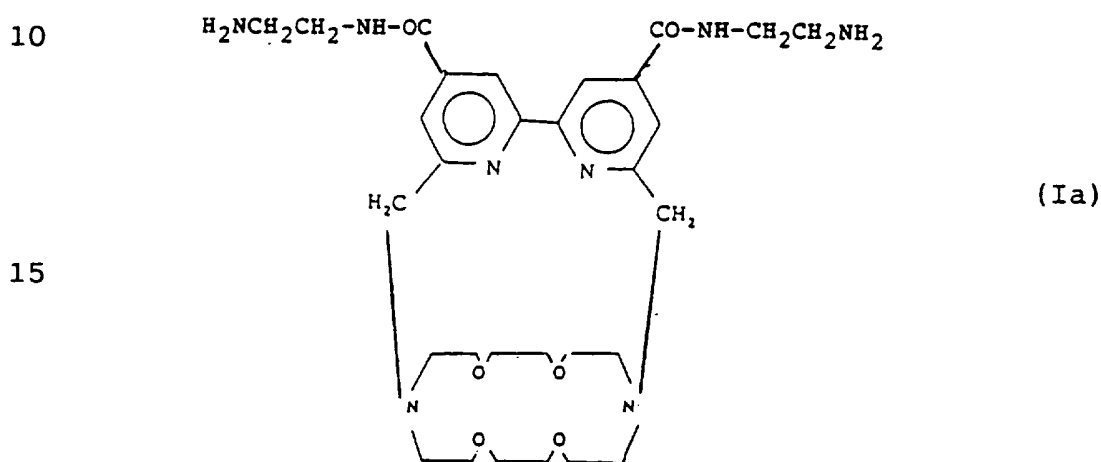
10. Patenttivaatimuksen 7 tai 8 mukaiset välituotteet, jotka ovat alkalimetallikryptaattien tai harvinaisten maametallien kryptaattien muodossa.

11. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 3 mukaisten kryptaattien käyttö fluoresoivina merkkeinä.

12. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 3 mukaisten kryptaattien käyttö fluoresoivina merkkeinä menetelmissä biologisten aineiden toteamiseksi ja/tai määrittämiseksi ja erityisesti homogeenisissa, luminointiin perustuvissa menetelmissä.

Patentkrav

1. 2,2-bispyridylkryptat av sällsynta jordmetaller, vilka kryptat består av minst ett salt av en sällsynt jordmetall, vilken valts ur gruppen nitrat, klorid, acetat och trifluoracetat och vilken komplexerats till ett substituerat bispyridinderivat med formeln Ia, Ib, IIa eller IIb



5

10

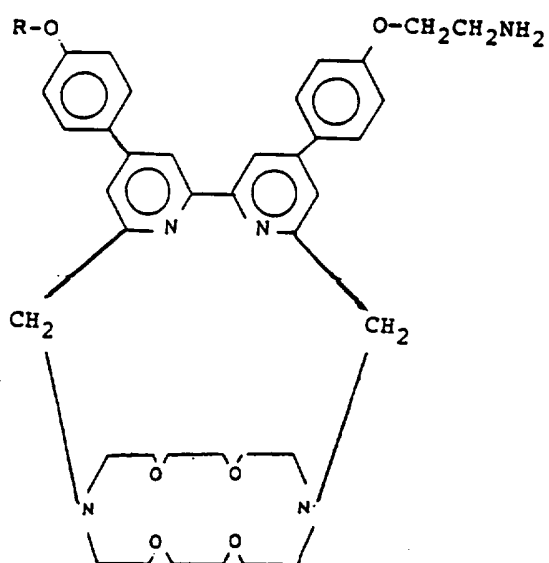
15

20

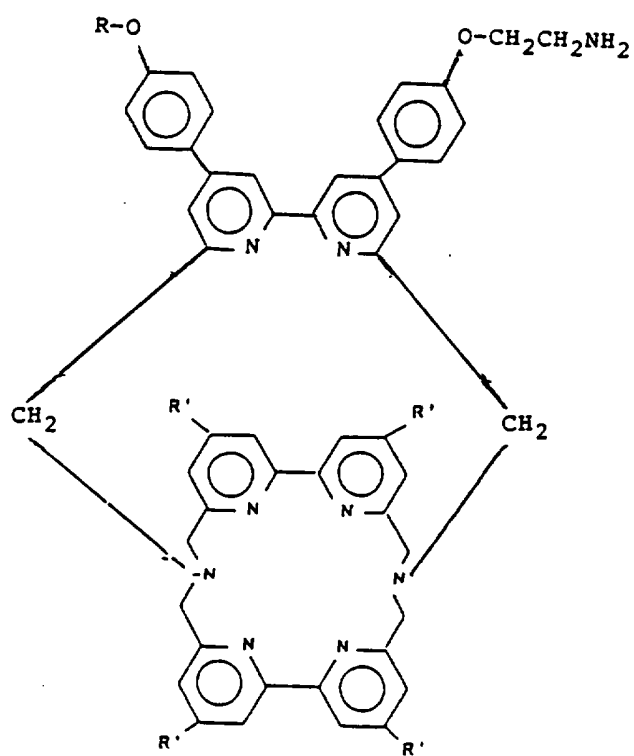
25

30

35



(IIa)



(IIb)

vari

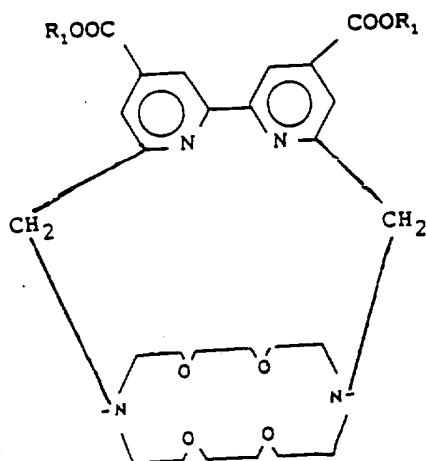
R är en metylgrupp eller en grupp $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$;

R' är väte eller en grupp $-\text{COOR}''$, vari R'' är en C_1 - C_{10} -alkylgrupp och företrädesvis en metyl-, etyl- eller tert-butylgrupp.

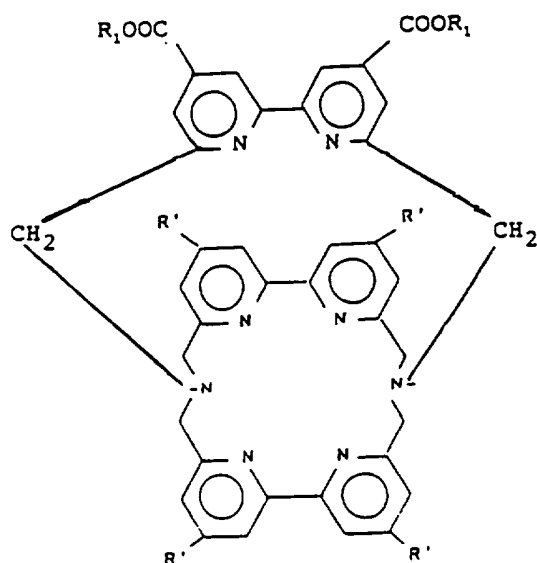
2. Kryptat enligt patentkrav 1 med formeln IIa eller IIb, vari R är en metylgrupp.

3. Kryptat enligt patentkrav 1 med formeln Ib, vari R' är en grupp $-\text{COOR}''$, vari R'' är definierad såsom i patentkrav 1.

4. Förfarande för framställning av kryptat med formeln Ia eller Ib enligt patentkrav 1, k ä n n e - t e c k n a t därav, att en förening med formeln 3a eller 3b



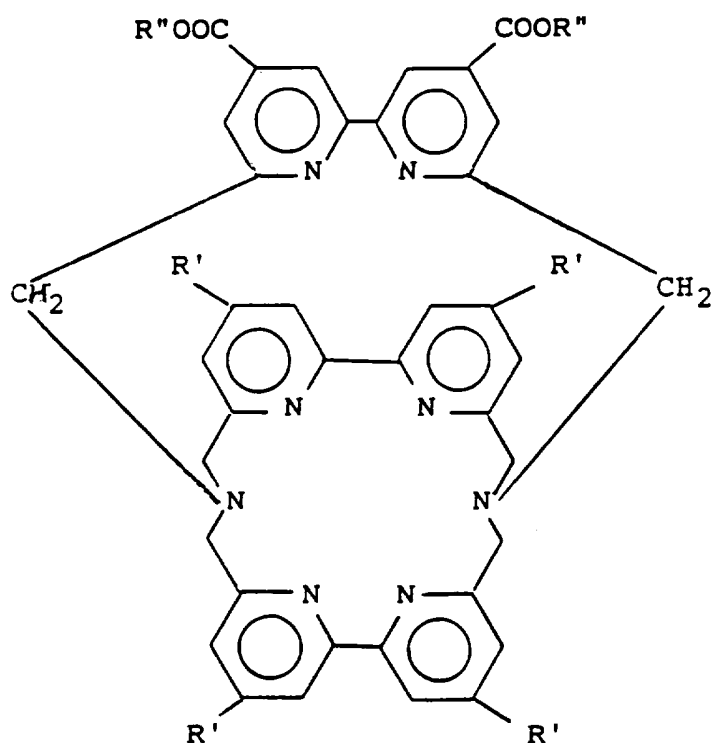
3a



3b

vari R_1 är en C_1 - C_{10} -alkylgrupp, underkastas en aminolys genom omsättning av densamma med en amin med formeln $NH_2-CH_2CH_2-NH_2$, vilken reaktion utförs i kväveskyddsgas vid omgivningens temperatur, varefter den erhållna föreningen genom jonbyte omvandlas till ett kryptat av en sällsynt jordmetall.

5. Förfarande för framställning av kryptat med formeln Ib enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att en förening med formeln 7



30 vari R' och R'' betecknar samma som i patentkrav 1, underkastas en aminolys genom omsättning av densamma med en amin med formeln $NH_2-CH_2CH_2-NH_2$, vilken reaktion utförs i kväveskyddsgas vid rumstemperatur, varefter den erhållna föreningen genom jonbyte omvandlas till ett kryptat av en sällsynt jordmetall.

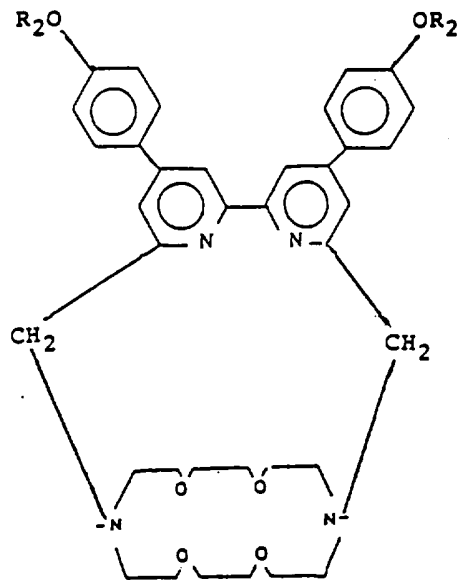
35

6. Förfarande för framställning av kryptat med formeln IIa eller IIb enligt patentkrav 1, k ä n n e - t e c k n a t därav, att en förening med formeln 10a eller 10b

5

10

15



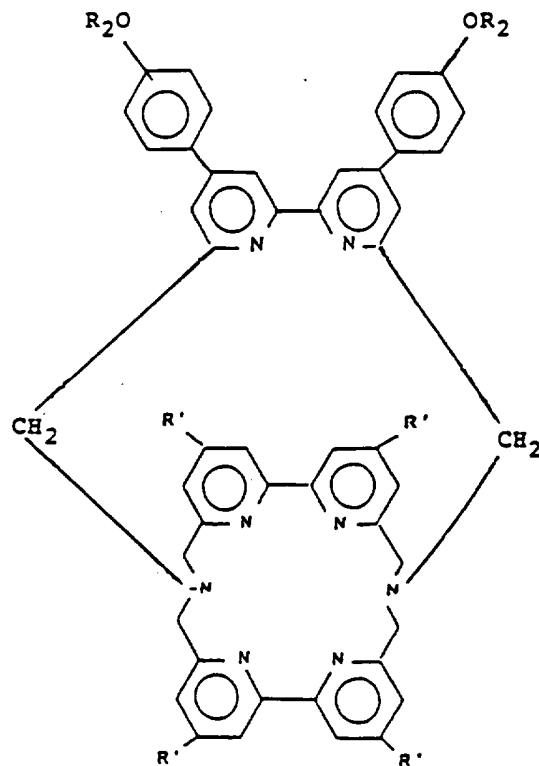
10a

20

25

30

35

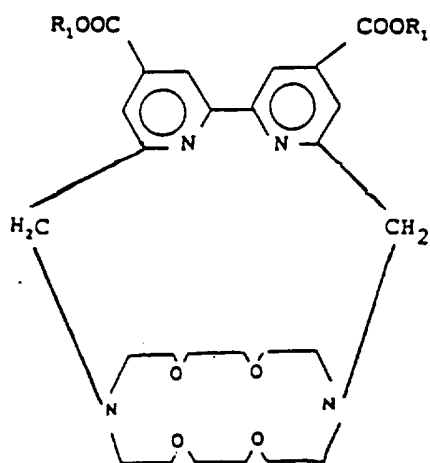


10b

vari R_2 är H eller CH_3 , substitueras med en halogenerad förening med formeln $X-CH_2CH_2-Z'$, vari Z' betecknar en grupp NH_2 eller dess prekursor och Y betecknar samma som i patentkrav 1 och X är en halogenidjon, varefter gruppen Z' , om så önskas, omvandlas till en grupp NH_2 , och den erhållna föreningen genom jonbyte omvandlas till ett kryptat av en sällsynt jordmetall.

7. Makropolycykliska komplex med formeln

10



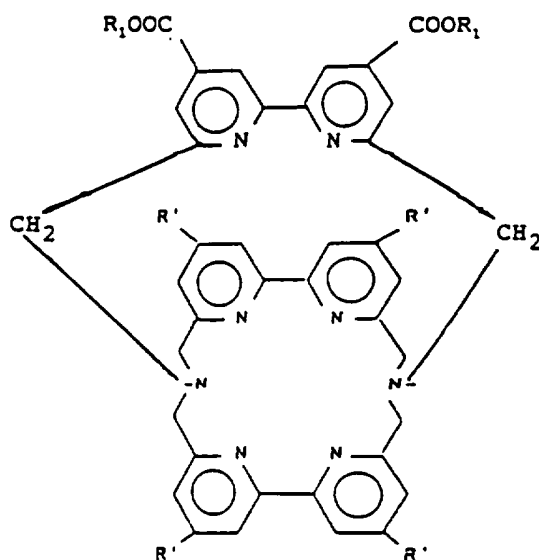
3a

15

20

eller

25



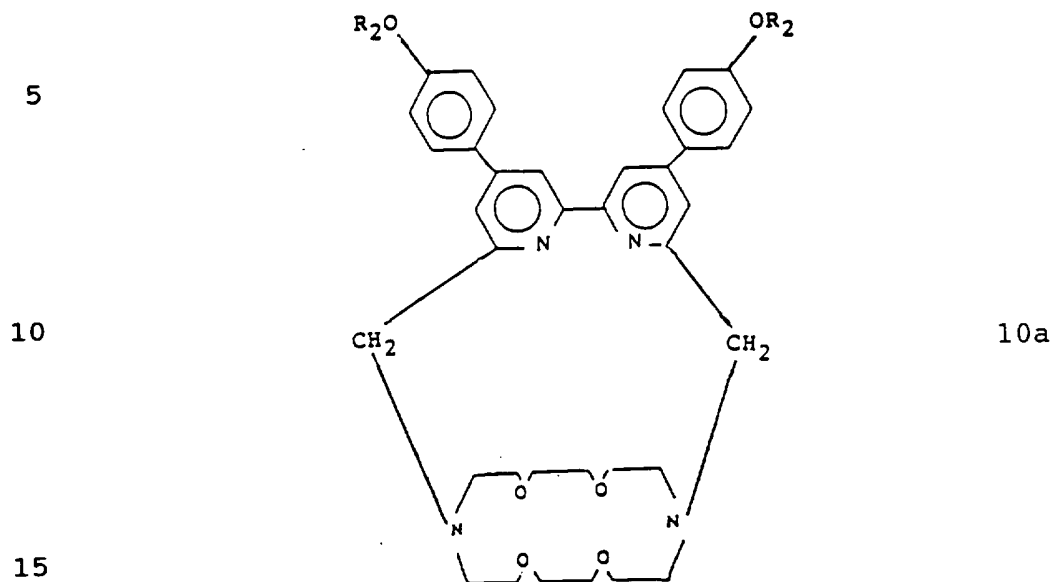
3b

30

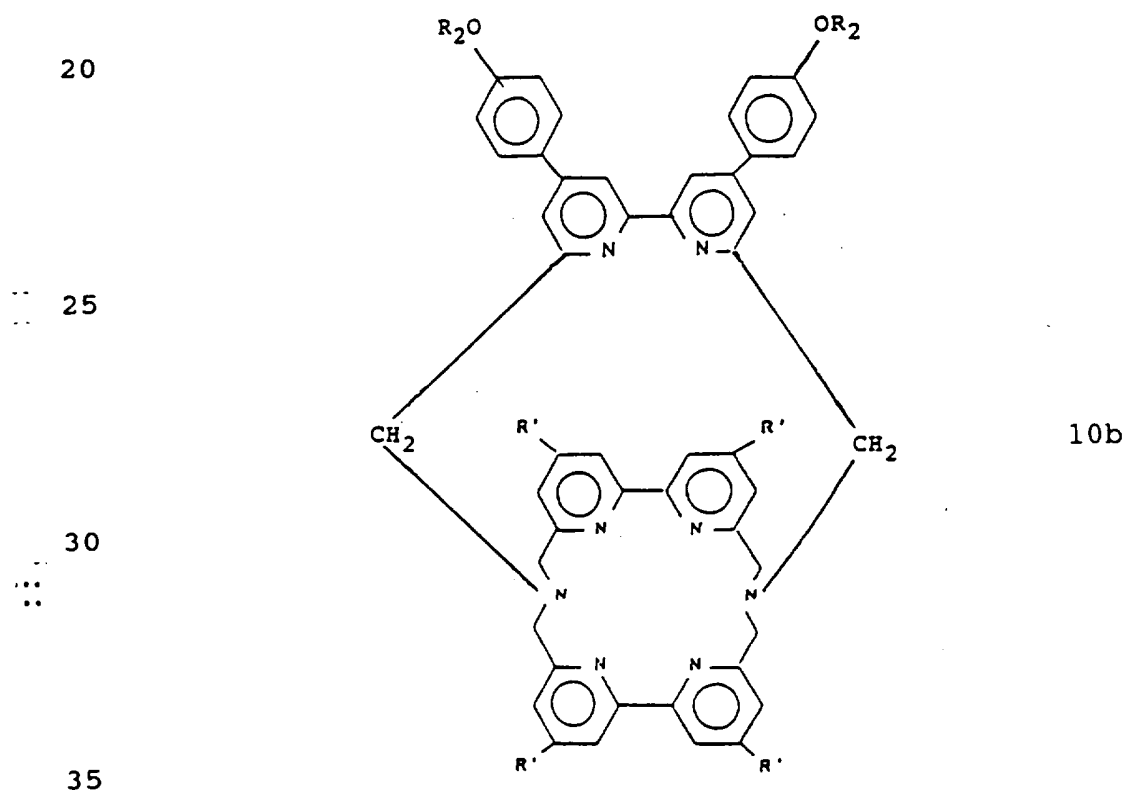
35

vari R_1 är definierad såsom i patentkrav 4.

8. Föreningar med formeln



eller



vari R_2 är H eller CH_3 .

9. Mellanprodukter enligt patentkrav 7 eller 8 vilka föreligger som fria kryptanter.

10. Mellanprodukter enligt patentkrav 7 eller 8 vilka föreligger i form av alkalimetallkryptat eller kryptat av sällsynta jordmetaller.

11. Användning av kryptat enligt något av patentkraven 1 - 3 som fluorescerande märken.

12. Användning av kryptat enligt något av patentkraven 1 - 3 som fluorescerande märken i förfaranden för detektion och/eller bestämning av biologiska substanser och speciellt i homogena förfaranden, vilka baserar sig på luminescens.

..

∴

∴