



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

254288

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.⁴

C 07 J 19/00

(22) Přihlášeno 12 03 85

(21) PV 1734-85

(40) Zveřejněno 14 05 87

(45) Vydáno 15 09 88

(75)

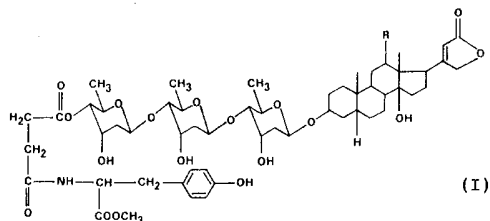
Autor vynálezu

POUZAR VLADIMÍR RNDr. CSc., ČERNÝ IVAN RNDr. CSc.,

DRAŠAR PAVEL RNDr. CSc., HAVEL MIROSLAV ing. CSc., PRAHA

(54) Způsob přípravy konjugátů kardiotonických glykosidů s L-tyrosinem

Řešení se týká způsobu přípravy konjugátů kardiotonických glykosidů s L-tyrosinem obecného vzorce I,



kde R je H nebo OH. Připraví se tak, že se nechá reagovat hemisukcinát kardiotonických glykosidů jako např. digitoxinu nebo digoxinu v organickém rozpouštědle s L-tyrosinmetylesterem a s N-ethoxykarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydrochinolinem, reakční směs se zředí dichlormethanem, promyje vodným roztokem organické kyseliny, vysuší, odpaří a vzniklý produkt se přečistí. Látky tohoto typu slouží po označení radionuklidem ¹²⁵I k přípravě komponent analytických a diagnostických RIA souprav.

Vynález se týká způsobu přípravy konjugátů kardiotonických glykosidů s L-tyrosinem.

Tyto konjugáty slouží k přípravě komponent /označených radionuklidem jodu ^{125}I / analytických a diagnostických RIA souprav /radioimuno assay/ /viz např. Polyevaya O. Yu. a kol., Chim. Farm. Ž. 17, /5/ 533 /1983/ nebo Calbiochem-Hoechst 1983 Biochemical and Immunochemical Catalog. str. 5 a 114/. Tyto soupravy se používají v klinické praxi pro stanovení obsahu kardiotonických glykosidů, hlavně digitoxinu a digoxinu, v krevním séru a moči.

Derivátů digoxinu vhodných pro označení radionuklidem jodu není mnoho. První práci v této oblasti je publikace G. C. Olivera a spol. /J. Clin. Invest. 47, /1968/ spočívající v reakci anhydridu kyseliny jantarové s digoxigeninem v pyridinu a ve využití takto získaného 3-hemisukcinátu k přípravě amidu s tyrosinmetylesterem. Tento postup je však vypracován jen na steroidní aglykon.

Patentovaný je postup R. N. Piasio a J. E. Woiszwilly /DE P 2505267/ spočívající v oxidaci cukerné části digoxinu jodistanem a v následné kondenzaci vzniklého dialdehydu s tyrosinmetylesterem. Obměnou tohoto postupu je práce N. D. Blazeyho /Clin. Chim. Acta 80, 403 /1977// používající histaminu místo tyrosinmetylesteru a natriumborohydridu k redukci aldiminu. Vznikající meziprodukty v uvedené publikaci nejsou chemicky charakterizovány.

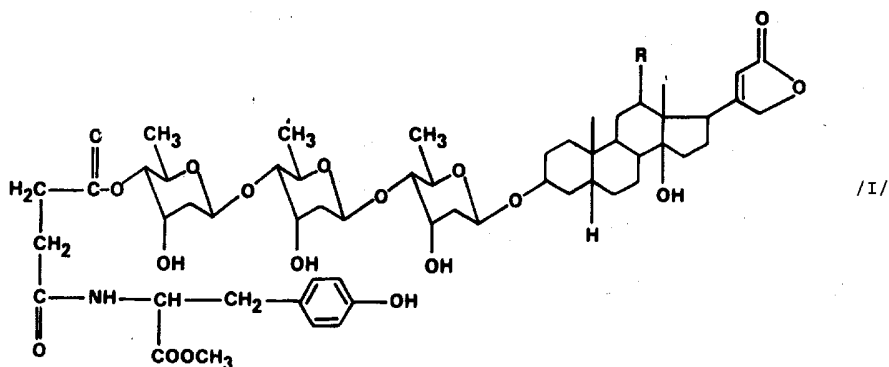
Dialdehyd vzniklý oxidací cukerné části digoxinové molekuly je výchozí sloučeninou dalšího patentovaného postupu K. C. Tovey a J. W. Findlaye /DE P 252 6984.5/. Dialdehyd je však kondenzován s kyselinou aminoxyoctovou a vzniklý derivát reakcí s tyraminem nebo histaminem poskytne žádaný substrát pro jodaci.

US patent 3 963 697 vychází z reakce digoxin nebo digitoxin 4'-hemisukcinátu s tyrosinmetylesterhydrochloridem za přítomnosti N,N'-dicyklohexylkarbodiimidu v pyridinu. Tento způsob přípravy však nezaručuje čistotu produktu, který je charakterizován jen UV spektrem. Právě čistota má však značný vliv na specifitu stanovení při použití jako radiligandu v analytických RIA soupravách.

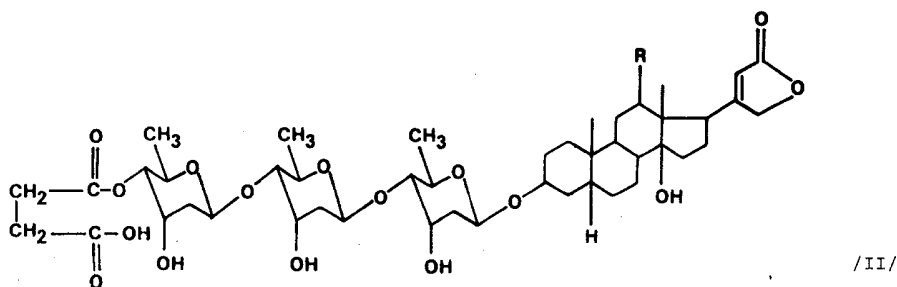
Poslední časopisecká publikace E. W. Weilera a M. H. Zenka /Clinical Chem. 25, No 1, 44 /1979/ obsahuje popis jiného postupu: digoxin je nejdříve "aktivován" bromkyanem za vzniku cyklického imidokarbonátu na C_4' a C_3' , který reakcí s tyraminem nebo p-hydroxy-fenylpropionylputrescinem poskytuje substrát vhodný pro jodaci. Práce s bromkyanem je však nepříjemná a nebezpečná.

Nevýhody těchto postupů odstraňuje způsob přípravy konjugátů kardiotonických glykosidů s L-tyrosinem podle vynálezu.

Podstatou vynálezu je způsob přípravy konjugátů kardiotonických glykosidů s L-tyrosinem obecného vzorce I,



kde R je H nebo OH. Uvedené sloučeniny se připraví tak, že se nechá reagovat hemisukcinát kardiotonického glykosidu jako například digitoxinu nebo obecného vzorce II,



kde R je H nebo OH v organickém rozpouštědle, nejlépe v tetrahydrofuranu nebo dimethoxymetanu za teploty 0 až +40 °C s L-tyrosinmetylesterem a s N-ethoxykarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydrochinolinem po dobu 10 až 70 hodin, reakční směs se zředí dichlormetanem, promyje vodným roztokem organické kyseliny s výhodou kyseliny citronové, vinné nebo jablečné, vysuší bezvodým síranem sodným či hořečnatým a odpaří, vzniklý produkt se přečistí.

Přečištění lze provést nejlépe chromatograficky na koloně silikagelu v soustavě dichlor-metan-metanol. Jako nejúčinnější se jeví rakce 4⁻⁻⁻⁻-hemisukcinátu kardiotonického glykosidu s L-tyrosinem v 3 až 6 molárním přebytku a s N-ethoxykarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydrochinolinem v 3 až 6 molárním přebytku.

Dále jsou uvedeny příklady způsobu přípravy dle vynálezu.

P ř í k l a d 1

Do roztoku digitoxin 4⁻⁻⁻⁻-hemisukcinátu /1.58 g, 1.82 mmol/ v tetrahydrofuranu /35 ml/ byl přidán L-tyrosinmetylester /1.54 g, 7.88 mmol/ a N-ethoxykarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydrochinolin /1.95 g, 7.87 mmol/. Po 70 hodinách míchání za teploty místnosti byla reakční směs zředěna dichlormetanem /400 ml/ a promyta 5% vodným roztokem kyseliny citronové, vodou a vysušena bezvodým síranem sodným. Odparek byl chromatografován na koloně silikagelu /200 g/ v soustavě dichlormetan-metanol /98:2/. Bylo získáno 310 mg /16 %/ amorfního konjugátu digitoxinu s L-tyrosinem. IČ spektrum /chloroform, cm⁻¹/: 3 600 /OH/, 3 425, 1 668, 1 521 /CONH/, 1 745 /Lakton + ester/. Pro C₅₅H₇₉NO₁₈ /1 042.2/ vypočteno: 63,38 % C, 7,64 % H, 1,34 % N; nalezeno: 63,25 % C, 7,55 % H, 1,45 % N.

P ř í k l a d 2

Do roztoku digoxin 4⁻⁻⁻⁻-hemisukcinátu /200 mg, 0.23 mmol/ v tetrahydrofuranu /5 ml/ byl přidán L-tyrosinmetylester /195 mg, 1 mmol/ a N-ethoxykarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydrochinolin /247 mg, 1 mmol/. Po 35 hodinách míchání za teploty místnosti byla reakční směs zředěna dichlormetanem /60 ml/, promyta 5% vodným roztokem kyseliny citronové, vodou, vysušena bezvodým síranem sodným a odpařena. Odparek byl chromatografován na koloně silikagelu /30 g/ v soustavě dichlormetan-metanol /95:5/. Bylo získáno 58 mg /24 %/ amorfního konjugátu digoxinu s L-tyrosinem. IČ spektrum /chloroform, cm⁻¹/: 3 605 /OH/, 3 440, 1 671, 1 510 /COHN/, 1745 /ester + lakton/.

Pro C₅₅H₇₉NO₁₉ /1 059.2/ vypočteno: 62,43 % C, 7,52 % H, 1,32 % N; nalezeno: 32,57 % C, 7,77 % H, 1,12 % N.

P ř í k l a d 3

Příprava byla provedena stejně jako v příkladu 1 s tím rozdílem, že reakce byla prováděna při teplotě $+40^{\circ}\text{C}$ po dobu 10 hodin. Bylo získáno 305 mg (16 %) amorfního konjugátu digosinu s L-tyrosinem. Při analýze bylo nalezeno 63,19 % C, 7,47 % H, 1,27 % N.

P ř í k l a d 4

Do roztoku digitoxin-4⁻⁻⁻-hemisukcinátu (1,58 g, 1,82 mmol) v 1,2-dimethoxyetanu (35 ml) byl přidán L-tyrosinmetylester (1,54 g, 7,88 mmol) a N-ethoxykarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydrochinolin (1,95 g, 7,87 mmol). Po 70 hodinách míchání za teploty místnosti byla reakční směs zředěna dichlormetanem (400 ml) a promyta 5% vodným roztokem kyseliny citronové, vodou a vysušena bezvodým síranem hořečnatým. Odparek byl chromatografován na koloně silikagelu (200 g) v soustavě dichlormetan-metanol (98:2). Bylo získáno 300 mg (15,8 %) amorfního konjugátu digitoxinu s L-tyrosinem. IČ spektrum (chloroform, cm^{-1}): 3 600 (OH), 3 425, 1 668, 1 521 (CONH), 1 745 (laktón + ester). Pro $\text{C}_{55}\text{H}_{79}\text{NO}_{18}$ (1 042,2) vypočteno: 63,38 % C, 7,64 % H, 1,34 % N; nalezeno 63,20 % C, 7,45 % H, 1,50 % N.

P ř í k l a d 5

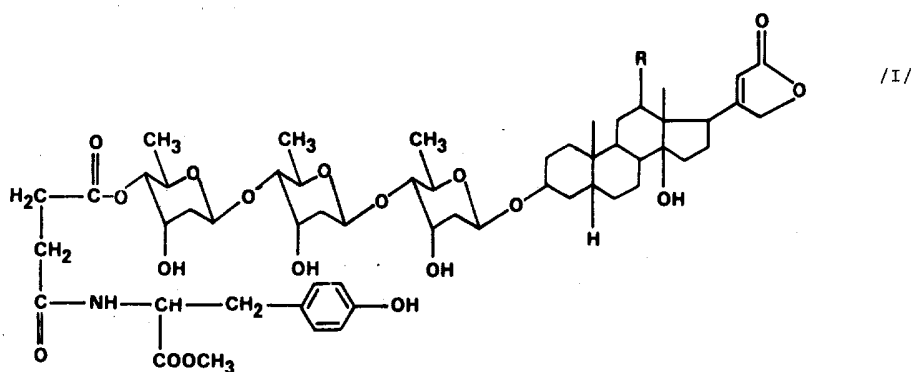
Příprava byla provedena jako v příkladu 3 s tím rozdílem, že k promývání byl použit 5% vodný roztok kyseliny vinné. Bylo získáno 55 mg (23 %) amorfního konjugátu digoxinu s L-tyrosinem. Při analýze bylo nalezeno: 62,64 % C, 7,75 % H, 1,54 % N.

P ř í k l a d 6

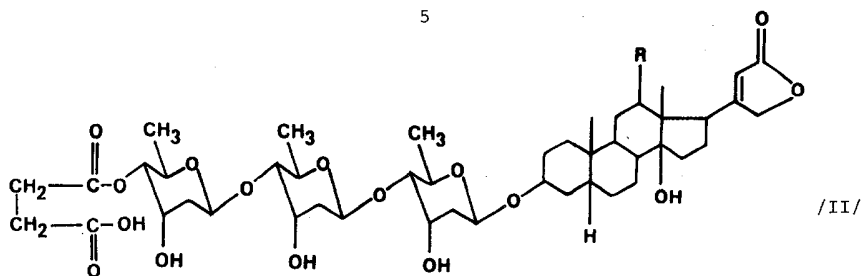
Příprava byla provedena stejně jako v příkladu 1 s tím rozdílem, že digitoxin 4⁻⁻⁻-hemisukcinát se nechal reagovat s 6molárním přebytkem L-tyrosinmetylesteru a N-ethoxykarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydrochinolinu při 0°C po dobu 70 hodin. Bylo získáno 305 mg (15,9 %) amorfního konjugátu digoxinu s L-tyrosinem. Při analýze bylo nalezeno: 63,18 % C, 7,46 % H, 1,25 % N.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

1. Způsob přípravy konjugátů kardiotinických glykosidů s L-tyrosinem obecného vzorce I,



kde R je H nebo OH, vyznačený tím, že se nechá reagovat 4⁻⁻⁻-hemisukcinát digoxinu nebo digitoxinu obecného vzorce II,



kde R je H nebo OH v organickém rozpouštědle s L-tyrosinmetylesterem a s N-ethoxykarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydrochinolinem, reakční směs se zředí dichlormetanem, promyje vodným roztokem organické kyseliny, vysuší a odpaří a vzniklý produkt se přečistí.

2. Způsob podle bodu 1 vyznačený tím, že jako organické rozpouštědlo se užívá tetrahydrofuran nebo dimetoxymetan.

3. Způsob podle bodu 1 vyznačený tím, že jako organická kyselina se užívá kyselina citronová, vinná nebo jablečná.

4. Způsob podle bodu 1 vyznačený tím, že jako sušidlo se užívá bezvodý síran sodný nebo hořečnatý.

5. Způsob podle bodu 1 vyznačený tím, že reakce se provádí za teploty 0 až +40 °C po dobu 10 až 70 hodin.

6. Způsob podle bodu 1 vyznačený tím, že 4''-hemisukcinát kardiotonického glykosidu se nechá reagovat s L-tyrosinmetylesterem v 3 až 6molárním přebytku a N-ethoxykarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydrochinolinem v 3 až 6molárním přebytku.

7. Způsob podle bodu 1 vyznačený tím, že vzniklý produkt se přečistí chromatograficky na koloně silikagelu v soustavě dichlormetan-metanol.