

FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

(11) 273 630

(13) B2

(51) Int. Cl.⁵
C 07 D 265/28//
G 01 N 33/536

(21) PV 1041-87.C
(22) Přihlášeno 18 07 86
(30) Právo přednosti od 25 07 85
DE (P 35 26 565.5)

(40) Zveřejněno 14 08 90
(45) Vydáno 13 03 92

(72) Autor vynálezu

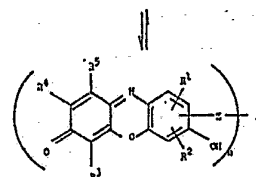
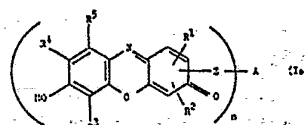
KLEIN CHRISTIAN dr., WEILHEIM,
BATZ HANS-GEORG dr., TUTZING,
HERRMANN RUPERT dr., WEILHEIM (DE)
BOEHRINGER MANNHEIM GMBH, MANNHEIM (DE)

(73) Majitel patentu

(54)

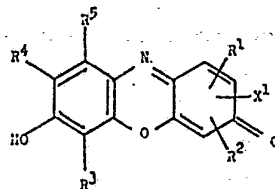
Způsob výroby derivátů resorufinu

(57) Způsob výroby derivátů resorufinu obecných vzorců Ia a Ib, ve kterých R^1 , R^2 , R^3 , R^4 a R^5 jsou stejné nebo navzájem rozdílné a znamenají vodík, halogen, karboxyskupinu, karboxamidoskupinu, C_{1-5} -alkoxykarbonylovou skupinu, kyanoskupinu, nitroskupinu, případně substituovaný C_{1-5} -alkyl nebo -alkoxyl; R^4 a R^5 mohou společně znamenat anelovaný aromatický uhlovodík se 6 až 10 atomy uhlíku, který je popřípadě substituován, Z znamená můstkový člen vytvořený ze zbytků X^1 , X^2 , X^3 , X^4 a M, A znamená zbytek haptenu, antigenu, protilátky, substrátu či nosiče a n znamená celé číslo od 1 do 200, spočívá v tom, že se na sloučeniny vzorců IIa a IIb, ve kterých X^1 znamená reaktivní skupinu, jako -COOH, -COOT, -COOCO₂T¹, -NCO, -NCS atd., působí diaminem, dikarboxylovou kyselinou nebo jejím derivátem, dialdehydem nebo aminokarboxylovou kyselinou obecného vzorce IV, ve kterém X^3 a X^4 znamenají reaktivní skupiny a M znamená zbytek bifunkční sloučeniny s 1 až 5 atomy uhlíku, a ligandem obecného vzorce III, ve kterém X^2 znamená reaktivní skupinu, jako NH₂, SH, OH, COOH; případně zavedené chránící skupiny se odštěpí a jednotlivé reaktivní skupiny X^1 až X^4 se popřípadě převedou na jiné reaktivní skupiny. Vyráběné sloučeniny se používají jako značkovací sloučeniny v chemických biologických postupech.

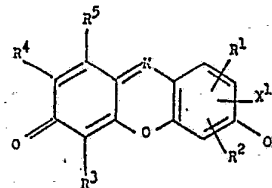


$X^3 - K - X^4$

$X^2 - A$



(IIa)



(IIb)

Vynález se týká způsobu výroby nových derivátů resorufinu, které mohou jakožto fluorescenčně značené nízkomolekulární a vysokomolekulární sloučeniny nacházet mnohostranné použití.

Fluoreskující sloučeniny nacházejí na základě své schopnosti vysílat po aktivaci světlem určité vlnové délky, široké použití jako značkové sloučeniny v chemických a biologických postupech, jako například v klinické analytice, avšak také ve stále větším počtu nových oblastí. V biochemii nacházejí fluorescenční barvivo jako vysoce citlivé značkové látky rostoucí použití. Přitom se používá jak sloučenin z fluorescenčních barviv s nízkomolekulárními, tak i vysokomolekulárními látkami. Jako příklady pro široký rozsah použití takovýchto fluorescenčních konjugátů lze uvést:

Fluorescenční imunoanalýzu, pro kterou se používá buď haptenu, antigen nebo specifická protilátka značená fluorescenčním barvivem. Specifickou vazbou protilátky na haptenu nebo antigen lze pomocí různých postupů stanovit koncentraci těchto látek nebo protilátky.

V imunofluorescenční mikroskopii se antigeny, jako například celé buňky nebo bílkoviny stávají pod mikroskopem působením fluorescenčně značených protilátek viditelnými (srov. Wang a další, *Meth. Enzymology* **85**, 514 a další).

Rovněž tak je možno přímo pozorovat rozdělení haptenu nebo antigenu v buňce, jestliže se do buňky přivede příslušná sloučenina fluorescenčně značená a sleduje se pod mikroskopem.

Fluorescenčně značené částice latexu nacházejí použití při třídění buněk v "Fluorescent Activated Cell Sorter" (FACS).

Nikoli v poslední řadě slouží látky nesoucí fluorescenční značení ke stanovení a měření aktivity enzymů.

Kompetitivní imunoanalýzy jsou založeny na konkurenci mezi ligandem, který se má stanovit ve vzorku, a značeným a ve známé koncentraci přítomným ligandem, týkající se známého, avšak omezeného počtu vazebných míst ligandů na protilátky, které jsou specifické jak pro určované, tak i pro značené ligandy. Koncentrace určovaného ligandu ve vzorku je rozhodující pro to, kolik značených molekul je vázáno na protilátky. Koncentrace komplexů sestávajících z protilátek a fluorescenčně značených ligandů je možno zjistit spektroskopickými metodami. Tato koncentrace je obráceně proporcionální vůči určované koncentraci ligandu, který se nachází ve vzorku. Jako značených ligandů, které se přidávají ke vzorku se stanovovanými ligandy ve známé koncentraci, se původně převážně používalo ligandů značených radioisotopy. Vzhledem ke známým nevýhodám značení radioisotopy nabývá značení fluoreskujícími sloučeninami na stále větším významu. Fluoreskující sloučeniny se přitom vážou na molekuly stanovované látky. Tyto konjugáty se pak mohou používat principiálně pro nejrozličnější fluorescenční imunoanalýzy, jako je například fluorescenční polarizační imunoanalýza, fluorescenční imunoanalýza s řízeným zastavením reakce nebo fluorescenční imunoanalýza s použitím pomocných prostředků.

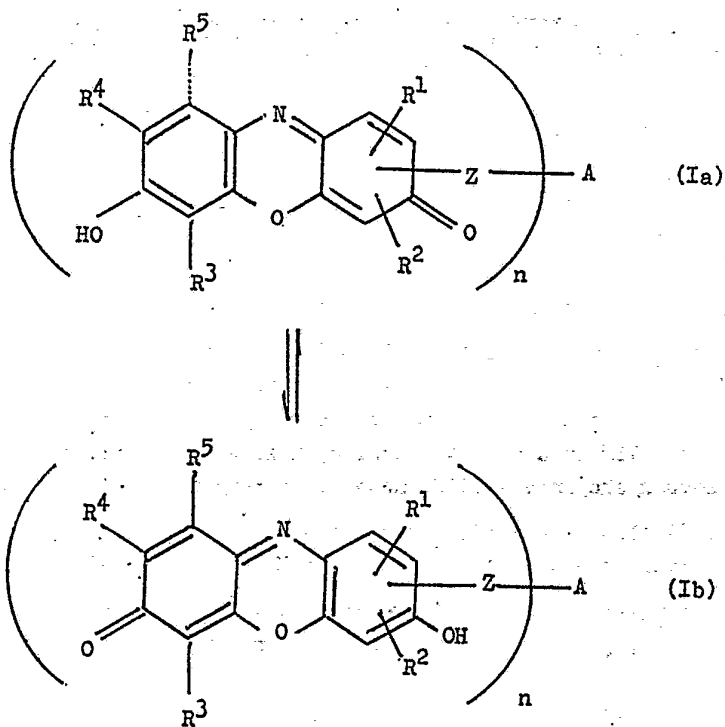
Jako značkové látky se hodí principiálně všechna fluorescenční barviva, která mají vysoký koeficient extinkce a vysoký kvantový výtěžek, jakož i dostatečnou stabilitu za podmínek, při kterých se test provádí. Dosud se tudíž obvykle používalo fluoresceinu nebo derivátu fluoresceinu (J. Landon and R. S. Kamel v: *Immunoassays* 80s, Univ. Park Press, Baltimore, Md., 1980, str. 91 až 112). Fluoresceinem nebo jeho deriváty značené vysokomolekulární nebo nízkomolekulární sloučeniny mají však různé nevýhody. Absorpční a emisní maxima látek značených fluoresceinem se pohybují ve vlnovém rozsahu mezi 490 a 520 nm. Vzhledem k tomu, že značná část analytických metod, především fluorescenční imunoanalýzy, se provádějí v tělních tekutinách, jako například v séru,

dochází v uvedeném spektrálním rozsahu k poruchám vlastní fluorescence biologického materiálu ve vzorku. Zejméně pak je to v důsledku bilirubinu, který rovněž absorbuje světlo v rozsahu vlnových délek kolem 500 nm a emituje fluorescence.

Mnohá měřicí zařízení vyžadují značící látky s pokud možno velkým Stokesovým posunem. U derivátů fluoresceinu činí tento posun nejvýše 30 nm. To vede k problémům s rozptylem světla, což ovlivňuje citlivost fluorescenčního měření. Pro takovéto případy by byly žádoucí sloučeniny s větším Stokesovým posunem, než jaký mají deriváty fluoresceinu.

Úkolem předloženého vynálezu bylo tudíž připravit sloučeniny, které by neměly uvedené nevýhody. Tento úkol byl vyřešen nalezením nových derivátů resorufinu.

Předmětem předloženého vynálezu je tudíž způsob výroby derivátů resorufinu obecných vzorců Ia a Ib



ve kterých

- R^1 , R^2 , R^3 , R^4 a R^5 , které mohou být vždy stejné nebo navzájem rozdílné, znamenají atom vodíku, atom halogenu, karboxyskupinu, karboxamid skupinu, alkoxykarbonylovou skupinu s 1 až 5 atomy uhlíku v alkoxylové části, kyanoskupinu, nitroskupinu, alkylovou skupinu s 1 až 5 atomy uhlíku nebo alkoxyskupinu s 1 až 5 atomy uhlíku, které jsou popřípadě substituovány karboxyskupinou, karboxamid skupinou, alkoxykarbonylovou skupinou s 1 až 5 atomy uhlíku v alkoxylové části, kyanoskupinou nebo nitroskupinou, přičemž R^4 a R^5 mohou společně představovat anelovaný aromatický uhlovodík se 6 až 10 atomy uhlíku, který je popřípadě substituován jednou nebo několika substituenty zvolenými ze skupiny, která je tvořena sulfoskupinou, karboxyskupinou a alkoxyskupinou s 1 až 5 atomy uhlíku,
- Z znamená můstkový člen vytvořený ze zbytků X^1 , X^2 , X^3 , X^4 a M, přičemž X^1 , X^2 , X^3 , X^4 a M mají dále uvedené významy,
- A znamená zbytek haptenu, antigenu, protilátky, substrátu či nosiče a
- n znamená celé číslo od 1 do 200.

Alkylové skupiny, popřípadě alkoxyskupiny ve významu substituentů R^1 , R^2 , R^3 , R^4 a R^5 obsahují uhlovodíkové řetězce s 1 až 5, výhodně s 1 až 3 atomy uhlíku. Zvláště výhodnými jsou methylová skupina a ethylová skupina, popřípadě methoxyskupina a ethoxyskupina.

Halogenem ve významu substituentů R^1 , R^2 , R^3 , R^4 a R^5 je fluor, chlor, brom nebo jod. Zvláště výhodnými jsou chlor a brom.

Anelovaný aromatický uhlovodík se 6 až 10 atomy uhlíku, který je tvořen substituenty R^4 a R^5 , je výhodně představován benzenem nebo naftalenem. Zvláště výhodným je benzen. Uvedené aromatické uhlovodíky mohou být nesubstituovány nebo mohou obsahovat jeden nebo několik substituentů, zvolených ze skupiny, která je tvořena sulfoskupinou ($-SO_3H$), karboxyskupinou ($-COOH$) nebo alkoxyskupinou s 1 až 5 atomy uhlíku.

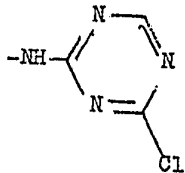
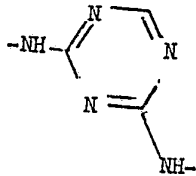
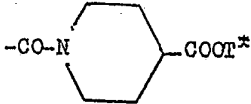
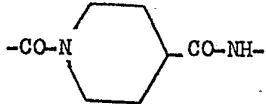
Můstkový člen Z se tvoří obvyklými adičními popřípadě kondenzačními reakcemi mezi reaktivním substituentem X^1 , X^2 , X^3 , X^4 a M.

V následující tabulce 1 jsou uvedeny příklady možných významů takovýchto substituentů X^1 a X^2 , jakož i můstkového členu Z, který z nich vzniká

T a b u l k a 1:

Některé významy reaktivních skupin X^1 a X^2 , jakož i můstkového členu Z, který z nich vzniká

X^1	X^2	Z
$-COOH$	$-NH_2$	$-CONH-$
$-COOCT^x$	$-NH_2$	$-CONH-$
$-COOCO_2T^{1xx}$	$-NH_2$	$-CONH-$
$-NCO$	$-NH_2$	$-NHCONH-$
$-NCS$	$-NH_2$	$-NHCSNH-$

X^1	X^2	Z
	$-\text{NH}_2$	
$-\text{HC}=\text{CH}-\text{CO}-$	$-\text{SH}$	$-\text{S}-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CO}-$
$-\text{CHO}$	$-\text{NH}_2$	$-\text{CH}=\text{N}-$
$-\text{SO}_2\text{Cl}$	$-\text{NH}_2$	$-\text{SO}_2\text{NH}-$
$-\text{COCH}_2-\text{halogen}$	$-\text{SH}$	$-\text{COCH}_2-\text{S}-$
$-\text{COCH}_2-\text{halogen}$	$-\text{OH}$	$-\text{COCH}_2-\text{O}-$
$-(\text{CH}_2)_m-\text{NH}_2^{\text{xxx}}$	$-\text{COOH}$	$-(\text{CH}_2)_m-\text{NH}-\text{CO}-$
	$-\text{NH}_2$	
x	T	znamená alkylovou skupinu s 1 až 5 atomy uhlíku nebo elektro-negativní aktivovanou esterovou skupinu, jako například N-hydroxy-sukcinimidoesterovou skupinu
xx	T ¹	znamená alkylovou skupinu s 1 až 5 atomy uhlíku
xxx	m	znamená celé číslo od 0 do 3.

Místo primárních aminů, tak jak jsou uvedeny v tabulce 1, se mohou jako reaktivní skupiny X^1 nebo X^2 používat podle smyslu také sekundární aminy za vzniku odpovídajících produktů.

Jako bifunkční sloučeniny obecného vzorce X^3-M-X^4 jsou výhodné diaminy, dikarboxylové kyseliny, jakož i jejich deriváty, dialdehydy, aminokarboxylové kyseliny a další sloučeniny, které se obvykle používají k výrobě takovýchto kopulovaných sloučenin. Jako příklady takovýchto sloučenin lze uvést piperazin, 1,2-ethylendiamin, jantarovou kyselinu, glutardialdehyd, glycin, sarkosin, β -alanin a piperidin-4-karboxylovou kyselinu.

Ligendem ve významu symbolu A se rozumí hapten, antigen, protilátka, substrát nebo nosič.

Haptenem se ve smyslu tohoto vynálezu rozumí látka s nižší molekulovou hmotností, které sama o sobě není zpravidla schopna tvořit protilátky. Jako látky s nižší molekulovou hmotností se označují sloučeniny s molekulovou hmotností od asi 100 do asi 2000. Jako příklady takových látek lze uvést fyziologicky aktivní látky, které jsou přítomny v organismu savců nebo lidí, jakož i jejich metabolity nebo léčiva, která se podávají zvířatům nebo lidem, jakož i jejich metabolity. Pojem "hapten" se však rozumí také další nízkomolekulární sloučeniny, pokud tyto sloučeniny mají molekulovou hmotnost pouze ve shora uvedeném rozmezí. Jako příklady možných haptenu lze uvést aminy, steroidy, hormony, glycidy, peptidy, oligonukleotidy, jejich kombinace atd.

Antigeny jsou vysokomolekulární sloučeniny. Antigeny mají obvykle schopnost tvořit v organismu, který byl jimi ošetřen, protilátky. Ve smyslu tohoto vynálezu jsou vysokomolekulárními sloučeninami takové sloučeniny, které mají molekulovou hmotnost alespoň 2000, výhodně však takové sloučeniny, které mají molekulovou hmotnost alespoň asi 5000. Molekulová hmotnost takovýchto sloučenin nemůže být směrem nahoru omezena. Může činit až hodnot 20 milionů, avšak může být ještě i nad touto molekulovou hmotností. Antigeny, které se mohou vyskytovat jako ligandy ve sloučeninách obecného vzorce Ia/Ib, jsou představovány bílkovinami, nukleovými kyselinami, polysacharidy, kombinacemi těchto látek nebo dalšími vysoce molekulárními látkami. Ve smyslu tohoto vynálezu se pojmem antigen rozumí všechny vysokomolekulární sloučeniny, které mají minimální molekulovou hmotnost alespoň asi 2000.

Protilátky jsou představovány všemi těmi bílkovinami nebo glykoproteiny, které s antigeny nebo hapteny, jakož i se sloučeninami, které jsou od nich odvozeny, specificky reagují a tvoří s nimi komplex. Podle vynálezu se mohou jako ligandy používat ve sloučeninách obecného vzorce Ia/Ib intaktní protilátky nebo také jejich fragmenty. Také tyto fragmenty se mohou podle vynálezu označovat jako protilátky pokud mají schopnost vázat antigeny, hapteny a od nich odvozené sloučeniny.

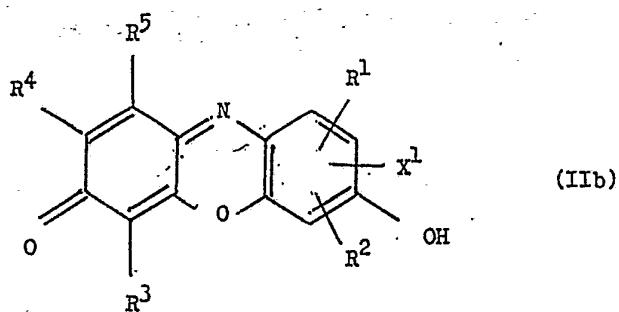
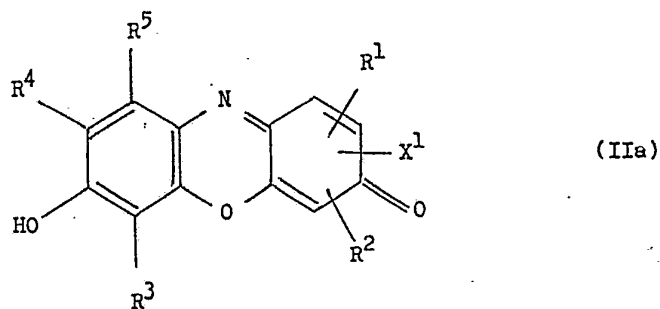
Substráty se rozumí sloučeniny, které v chemické reakci zůstávají bez prokazatelné změny. Tak například se mohou těmito substráty rozumět všechny ty sloučeniny nebo od nich odvozené látky, na které působí enzymy, jako jsou například aminokyseliny, peptidy, bílkoviny, glykosidy, oligosacharidy nebo polysacharidy, nukleotidy, nukleinové kyseliny, kombinace těchto látek nebo další enzymaticky změnitelné látky.

Nosiči mohou být přirozeně se vyskytující nebo syntetické, zesíťné nebo nezesíťné materiály s určitou formou nebo bez určité formy. Rozumí se jimi jednotlivé sloučeniny nebo směsi sloučenin. Jako nosiče se mohou používat například sloučeniny nebo směsi sloučenin, jako jsou polysacharidy, nukleové kyseliny, peptidy, bílkoviny, kombinace těchto látek nebo také klovatina, lignin, sklo, uhlí, syntetické adiční nebo kondenzační polymery, jako polystyren, polyakryl, vinylové sloučeniny, polyester, polyethery a polyamidy nebo také komplexní útvary, jako částice latexu, vesikel, liposomy, části buněčných stěn nebo dokonce celé buňky.

Zásadně se mohou k tvorbě sloučenin obecného vzorce Ia nebo Ib podle vynálezu používat všechny ligandy, které obsahují volné aminoskupiny, hydroxylové skupiny, merkaptoskupiny nebo karboxylové skupiny, přes které se mohou ligandy vázat se základním skeletem resorufinu za mezizařazení můstkového členu. Zvláště výhodnými jsou volné aminoskupiny nebo karboxylové skupiny. Volnými aminoskupinami se rozumí jak primární, tak i sekundární aminoskupiny. Nemají-li ligandy žádné vhodné skupiny, pak se musí takové skupiny zavést syntetickou cestou, jako například aminoskupiny nebo karboxylové skupiny. Dále je možné, popřípadě přítomné, nereaktivní funkční skupiny takových ligandů chemicky aktivovat. Vzhledem k tomu, že takto vzniklé látky nejsou s původními sloučeninami již zcela shodné, hovoří se o analogích ligandů.

Číslo n udává, kolik molekul resorufinu je vázáno na jeden ligand. Toto číslo závisí na počtu reaktivních skupin v odpovídajícím ligandu nebo analogonu ligandu. Čím více reaktivních skupin ligand má, tím více molekul resorufinu se může vázat. Číslo n činí obvykle 1 až 200, zvláště výhodně 1 až 100.

Podle tohoto vynálezu se sloučeniny obecných vzorců Ia a Ib připravují tím, že se na sloučeniny obecných vzorců IIa a IIb



ve kterých

R^1, R^2, R^3, R^4 a R^5 mají významy uvedené pod obecným vzorcem Ia a Ib, a
 X^1 znamená reaktivní skupinu,
 působí bifunkční sloučeninou obecného vzorce IV



ve kterém

X^3 a X^4 znamenají reaktivní skupiny a
 M znamená zbytek bifunkční sloučeniny,
 a ligandem obecného vzorce III



ve kterém

X^2

znamená reaktivní skupinu a

A

znamená zbytek ligandu,

příčemž se popřípadě při jednotlivých reakčních stupních zavedou chránicí skupiny a potom se opět odštěpí a jednotlivé reaktivní skupiny X^1 , X^2 , X^3 a X^4 se mohou převést na jiné reaktivní skupiny.

Reaktivními skupinami ve významu substituentů X^1 , X^2 , X^3 a X^4 se mohou rozumět principiálně všechny obvyklé reaktivní funkční skupiny. Zvláště výhodné jako funkční skupiny jsou zbytky kyselin, jako karboxylových kyselin nebo sulfonových kyselin, jakož i od nich odvozené skupiny, jako estery, amidy, anhydridy, halogenidy, kyselin, nebo různé zbytky jako primárního nebo sekundárního aminu, kyanátové, isokyanátové, thiokyanátové, isothiokyanátové, aldehydové, sulfhydrylové, hydroxylové, α -ketohalogenidové zbytky atd.



ve kterém

X^3 a X^4

znamenají reaktivní skupiny a

M

znamená zbytek bifunkční sloučeniny s 1 až 5 atomy uhlíku

a ligandem obecného vzorce III



ve kterém

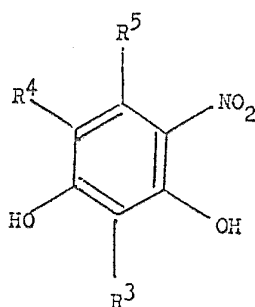
X^2

znamená reaktivní skupinu, jako skupinu $-NH_2$, $-SH$, $-OH$, $-COOH$ nebo sekundární aminoskupinu odpovídající skupině $-NH_2$, nebo má význam shora uvedeného substituentu X^1 a tím, že při téže reakci je význam substituentů X^1 a X^2 stejný nebo navzájem různý, a

A

má shora uvedený význam,

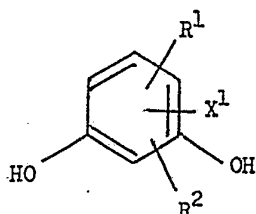
příčemž se popřípadě při jednotlivých reakčních stupních zavedou chránicí skupiny a potom se opět odštěpí a jednotlivé reaktivní skupiny X^1 ,



(V)

ve kterém

R^3 , R^4 a R^5 mají význam uvedený shora,
reakcí s deriváty resorcinu obecného vzorce VI



(VI)

ve kterém

R^1 a R^2

mají shora uvedený význam a

X^1

znamená reaktivní skupinu.

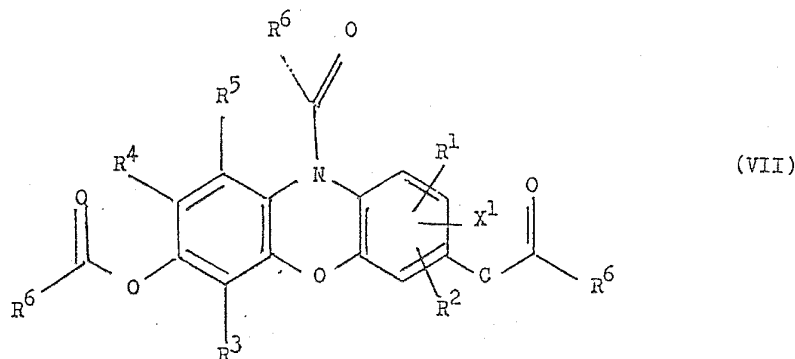
Reakce sloučenin obecného vzorce V s deriváty resorcinu obecného vzorce VI se provádí účelně v přítomnosti oxidu mangančitého a kyseliny sírové při nízkých teplotách. Při reakci vznikají nejdříve deriváty resazurinu, které se dají snadno převést na deriváty resorufinu obecného vzorce IIa a IIb.

Reakce sloučenin obecného vzorce V se sloučeninami obecného vzorce VI se provádí obvykle při teplotách mezi -10 a 50 °C, výhodně při teplotách mezi 0 a 30 °C. Zvláště šetrně probíhá reakce, jestliže se sloučeniny obecného vzorce V a obecného vzorce VI smísí při teplotě asi 0 °C a reakční směs se pak nechá zahřát na teplotu místnosti. Koncentrace oxidu mangančitého má činit účelně $0,5$ až 5 , výhodně 1 až 2 mol/litr. Koncentrace kyseliny sírové by měla činit $0,5$ až 5 , výhodně 1 až 3 mol/litr.

Redukce zprvu vzniklých derivátů resazurinu na resorufiny obecných vzorců IIa a IIb se provádí výhodně v amoniakálním roztoku zinkovým prachem /srov. Nietzki a další, Ber. Dtsch. Chem Ges. 22, 3020 (1889)/ nebo natriumborhydridem. Jako rozpouštědla se používá účelně směs vody a alkoholu, výhodně směs sestávající z 1 dílu vody a 0 až 4 dílů methanolu. Na 1 mol redukované sloučeniny se přidává 1 až 20 , výhodně 1 až 5 mol zinkového prachu, popřípadě natriumborhydridu. Teplota reakčního roztoku se přitom udržuje na -10 až $+35$ °C, výhodně na $+5$ až $+10$ °C. Přesné dodržování teplotního rozsahu se ukázalo jako nutným opatřením pro jednoznačný průběh reakce. Bez chlazení vede exothermní reakce k vedlejším produktům, které lze těžko oddělit.

Za zvolených mírných podmínek probíhá reakce mezi látkami obecného vzorce V a obecného vzorce VI jednoznačně a s dobrým výtěžkem. Zvolený způsob syntézy je ovšem schopen obměn. To otevírá zejména s ohledem na přípravu nesymetricky substituovaných derivátů resorufinu četné možnosti syntézy. V důsledku tohoto mimořádně variabilního způsobu výroby je dostupná celá řada sloučenin značených resorufinem, které svými rozdílnými substituenty v různých polohách chromoforu otevírají široký rozsah barev.

Před reakcí derivátů resorufinu obecných vzorců IIa a IIb se sloučeninami obecného vzorce IV a III se sloučeniny obecných vzorců IIa a IIb převádějí účelně na deriváty triacyldihydroresorufinu obecného vzorce VII



ve kterém

R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 a X^1
 R^6

mají význam uvedený v obecných vzorcích I Ia a I Ib a
 znamená alkylovou skupinu, arylovou skupinu nebo
 aralkylovou skupinu.

Alkylovou skupinou ve významu substituentu R^6 je alkylová skupina s 1 až 5 atomy uhlíku, výhodně s 1 až 3 atomy uhlíku. Zvláště výhodnou je methylová skupina a etylová skupina. Jako arylová skupina je zvláště výhodná fenylová skupina. Aralkylová skupina obsahuje výhodně jako arylovou část fenylovou skupinu, zatímco alkylová část obsahuje 1 až 5 atomů uhlíku, výhodně 1 až 3 atomy uhlíku. Jako aralkylová skupina je zvláště výhodná benzylová skupina.

Za účelem výroby triscylderivátů obecného vzorce VII se odpovídající deriváty resorufinu obecných vzorců I Ia a I Ib nejdříve elektrochemicky redukuje pomocí silného redukčního činidla, jako například chloridu cínatého nebo octanu chromnatého. Za účelem redukce se zahřívá derivát resorufinu 10 minut až jednu hodinu se 2 až 10, výhodně se 2 až 6 ekvivalenty redukčního činidla ve vhodném rozpouštědle, výhodně s chloridem cínatým v 5 až 35% vodné chlorovodíkové kyselině. Při ochlazení se vyloučí dihydroderivát. Acylace se provádí obvyklým způsobem působením vhodného acylačního činidla, například acetanhydridu, benzoylchloridu atd. Výhodně se sloučeniny obecného vzorce VII vyrábějí postupem prováděným v jediné reakční nádobě redukcí acylací derivátů resorufinu obecného vzorce I Ia a I Ib. Odpovídající derivát resorufinu se pro tyto účely zahřívá se 2 až 6 ekvivalenty redukčního činidla po dobu 5 minut až 3 hodin za přítomnosti acylačního činidla ve vhodném rozpouštědle k varu pod zpětným chladičem nebo při teplotě místnosti po dobu 4 až 16 hodin.

V takto získaných derivátech triscyldihydroresorufinu obecného vzorce VII lze přeměnit reaktivní skupinu X^1 před další reakcí popřípadě na jinou reaktivní skupinu. Zejména, jestliže X^1 znamená karboxylovou skupinu, je účelné převést tuto skupinu na chlorid karboxylové kyseliny, na anhydrid karboxylové kyseliny nebo na reaktivní esterovou funkci. To lze provádět nejrozumnějšími způsoby, například působením karbodiimidů, alkoholů, halogenidů, N-hydroxysukcinimidu atd. Odborníci jsou v tomto směru k dispozici četné postupy známé z literatury. Zvláště výhodné je převedení funkce karboxylové kyseliny na chlorid karboxylové kyseliny, například působením směsi thionylchloridu

a dimethylformamidu nebo směsi oxalylchloridu a dimethylformamidu, jakož i na aktivovaný ester, například na N-hydroxysukcinimidester.

Obsahuje-li ligand nebo analog ligandu volnou aminoskupinu, hydroxylovou skupinu nebo merkaptoskupinu, pak mohou tyto ligandy reagovat jako reaktivní skupiny X^2 . Ligandy, popřípadě analoge ligand vzorce X^2-A pak mohou přímo reagovat se sloučeninami obecného vzorce IIa a IIb, popřípadě po předchozí přeměně na deriváty triacyldihydroresorufinu nebo/a po aktivaci skupiny X^1 za vzniku amidů, esterů nebo thioesterů. Na základě své stability se za zvláště výhodný pokládá vznik alespoň jedné amidové vazby, přičemž se za účelem jejího vzniku vychází výhodně ze sloučenin obecných vzorců IIa/IIb, popřípadě VII, ve kterých X^1 znamená halogenid karboxylové kyseliny. Jeho reakce s ligandem, který obsahuje aminoskupinu, popřípadě s analogonem ligandu, který obsahuje aminoskupinu, se provádí podle obvyklých metod, například v organickém rozpouštědle, jako v dichlormethanu, za přídavku terciárního aminu, jako triethylaminu, jako báze. Vždy podle velikosti ligandu, popřípadě analogonu ligandu a s tím souvisejícím počtem jeho volných aminoskupin a podle použitého množství sloučenin obecných vzorců IIa/IIb se může na jednu molekulu ligandu, popřípadě na jednu molekulu analogonu ligandu vázat několik chromoforů.

Použijí-li se k výrobě sloučenin obecných vzorců Ia a Ib podle vynálezu triacyl-deriváty obecného vzorce VII, pak se musí po reakci acylové zbytky části dihydroresorufinu, které byly použity jako chránicí skupiny, selektivně odštěpit a výsledný zbytek leukobarviva se oxiduje na chromofor sloučeniny obecného vzorce Ia/Ib.

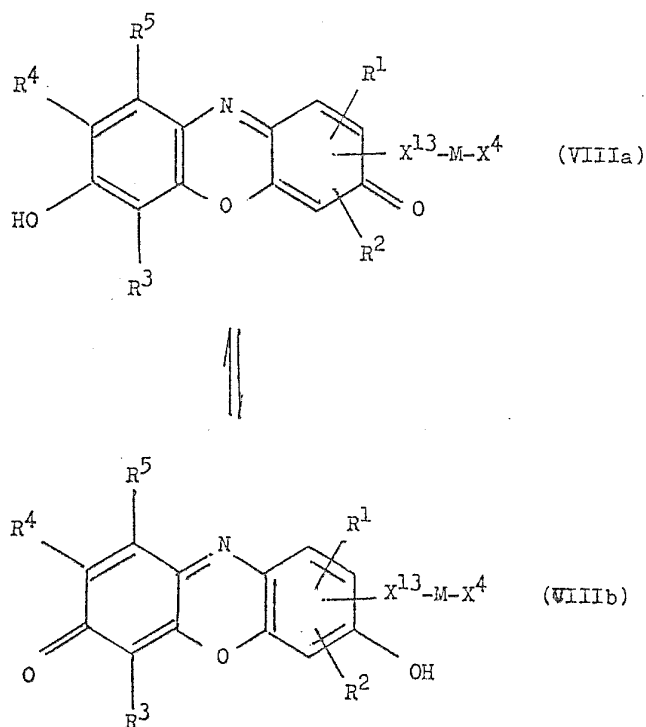
O-Acylové zbytky části dihydroresorufinu se odštěpují zvláště výhodně reakcí se 2 až 10 mol, výhodně se 2 až 4 mol siřičitanu sodného, ve směsi vody a rozpouštědla, které je rozpustné ve vodě, jako 1,4-dioxanu, methanolu nebo ethanolu, výhodně ve směsi vody a 1,4-dioxanu v poměru 1:1. Reakční teplota činí 20 až 100 °C, výhodně 80 až 100 °C. Za těchto reakčních podmínek se dají deriváty N-acyldihydroresorufinu vyrábět ve vysokých výtěžcích.

Oxidace části dihydroresorufinu na sloučeniny obecných vzorců Ia a Ib se může provádět působením mírných oxidačních činidel. Výhodně se používá hexakvanoželezitanu draselného, který je přítomen ve dvojnásobném až šestnásobném molárním nadbytku, zvláště výhodně ve dvojnásobném až čtyřnásobném molárním nadbytku vůči leukobarvivu ve směsi vody a rozpouštědla, které je mísitelné s vodou, jako je 1,4-dioxan, methanol nebo ethanol, výhodně ve směsi vody a methanolu v poměru 3:1. Reakce se výhodně provádí v přítomnosti pomocné báze, jako hydrogenuhlíčitanu sodného nebo uhlíčitanu sodného. Reakční teplota činí 10 až 40 °C, výhodně pak se pracuje při teplotě místnosti.

Zvláště výhodně je možno provádět selektivní odštěpení N-acylového zbytku, jež byl použit jako chránicí skupina, a oxidace části dihydroresorufinu v jediné reakční nádobě. Za tím účelem se k N-acylovanému derivátu dihydroresorufinu ve směsi vody a methanolu v poměru 3:1 přidá nejdříve 2 až 4 mol hydrogenuhlíčitanu sodného a ekvimolární množství 1N roztoku hydroxidu sodného a potom 2- až 4-násobný molární nadbytek hexakvanoželezitanu draselného. Po asi 10 minutách až 2 hodinách, výhodně po 0,5 hodině při teplotě místnosti je reakce ukončena.

Je účelné spojit sloučeniny obecných vzorců IIa/IIb s ligandem, popřípadě s analogem ligandu III za mezizařazení seskupení X^3-M-X^4 . Pro tyto účely se mohou používat všechny sloučeniny, které se obvykle používají pro tuto reakci, výhodně s alespoň dvěma reaktivními skupinami. Zvláště výhodné jsou diaminy nebo aminokarboxylové kyseliny. Volba se přitom řídí podle druhu funkčních skupin X^1 a X^2 , které se mají kopulovat se sloučeninou tvořící můstek.

Sloučeniny, které se získají reakcí derivátů resorufinu obecných vzorců IIa/IIb s bifunkčními sloučeninami obecného vzorce IV v jednom nebo v několika stupních, například přes sloučeniny obecného vzorce VII, lze znázornit obecnými vzorci VIIIa a VIIIb



ve kterých

R^1 , R^2 , R^3 , R^4 a R^5 mají významy uvedeny pod obecnými vzorci Ia a Ib a
 M a X^4 mají významy uvedené pod obecným vzorcem IV a
 X^{13} znamená funkční skupinu, která vzniká reakcí skupin X^1 a X^3 .

Funkčními skupinami X^{13} mohou být všechny v úvahu přicházející skupiny, které vznikají reakcí reaktivních skupin uvedených ve významu substituentů X^1 a X^3 navzájem. Výhodnými skupinami X^{13} jsou amidy, thioethery, ethery, sekundární nebo terciární aminy, ureidoskupiny a thioureidoskupiny atd.

Znamená-li substituent X^1 v obecných vzorcích IIa/IIb, popřípadě v obecném vzorci VII funkci karboxylové kyseliny, popřípadě od ní odvozenou reaktivní skupinu a představují-li reaktivní substituenty X^2 ligandu, popřípadě analogonu ligandu aminoskupiny, hydroxylové skupiny nebo merkaptoskupiny, pak se volí účelně mezimístek X^3-M-X^4 , přičemž X^3 znamená aminoskupinu a X^4 znamená funkci karboxylové kyseliny, popřípadě jejího reaktivního derivátu. Terminální aminoskupina se může vázat na funkci karboxylové kyseliny sloučenin obecných vzorců IIa/IIb, popřípadě obecného vzorce VII, a terminální karboxyskupina se může vázat na ligand nebo analogon ligandu X^2-A . Představují-li však jak X^1 , tak i X^2 vždy funkci karboxylové kyseliny, popřípadě od ní odvozený

aktivovaný derivát, pak se jako mezimůstek volí diaminy.

Reakce derivátů resorufinu obecného vzorce IIa a IIb s bifunkčním mezimůstkem obecného vzorce IV a ligandem, popřípadě analogonem ligandu se provádí výhodně ve dvou stupních. Nejdříve se mohou spojit sloučeniny obecných vzorců IIa/IIb, popřípadě po předchozím převedení na aktivní sloučeniny obecného vzorce VII, s mezimůstkem obecného vzorce IV. Z této reakce vzniklé deriváty se pak mohou ve druhém stupni uvádět v reakci s ligandem, popřípadě s analogonem ligandu obecného vzorce III. Je samozřejmě možné volit i obrácené pořadí, tj. vázat v prvním stupni mezimůstek obecného vzorce IV na ligand, popřípadě na analogon ligandu obecného vzorce III a získaný produkt potom ve druhém stupni nechat reagovat s derivátem resorufinu obecného vzorce IIa/IIb, popřípadě s aktivovanou sloučeninou obecného vzorce VII.

Jako aminokarboxylové kyseliny se používají výhodně aminokarboxylové kyseliny. Jako zvláště výhodné se ukázaly glycin, alanin, sarkosin a piperidin-4-karboxylová kyselina. Kopulace derivátů resorufinu obecných vzorců IIa/IIb, popřípadě VII s aminokarboxylovými kyselinami za vzniku amidické vazby se provádí podle metod, které jsou každému odborníkovi běžné. Zcela zvláště výhodné je pro tyto účely použití methylesterů nebo terc.butylesterů odpovídajících aminokyselin. Po vzniku amidické vazby se popřípadě odštěpí předtím zavedené chránicí skupiny a to selektivně podle obvyklých metod. Nechali se reagovat například aktivovaný derivát obecného vzorce VII s aminokarboxylovou kyselinou, která má chráněnou karboxyskupinu, pak je zapotřebí selektivně hydrolyzovat O- a N-acylové skupiny dihydroresorufinového skeletu, leukobarvivo opět oxidovat na resorufinový systém a potom odštěpit za obvyklých podmínek chránicí skupinu karboxyskupiny vázanou na aminokarboxylovou kyselinu, výhodně působením trifluoroctové kyseliny. Volná karboxylová kyselina se potom může aktivovat za účelem konjugace ligandu nebo analogonu ligandu obecného vzorce III příslušným způsobem, jak popsáno pro deriváty resorufinu obecných vzorců IIa a IIb. Tato konjugace sama se provádí analogicky, jak je uvedeno pro přímou konjugaci ligandů nebo analog ligandů na deriváty resorufinu obecných vzorců IIa a IIb.

V případě ligandů obsahujících karboxylové skupiny nebo analogů ligandů obsahujících karboxylové skupiny je účelné převést deriváty resorufinu obecných vzorců IIa/IIb, popřípadě obecného vzorce VII na sloučeniny, které obsahují aminoskupiny, které potom lze uvádět v reakci s ligandy, které obsahují karboxylové skupiny, popřípadě s analogy ligandů, které obsahují karboxylové skupiny, za vzniku amidické vazby. Pro tento účel se jako zvláště jednoduchá a výhodná ukázala reakce sloučenin obecných vzorců IIa/IIb, popřípadě obecného vzorce VII s diaminy (obecný vzorec IV s aminoskupinou ve významu X^3 a X^4). Výhodnými diaminy v tomto smyslu jsou například piperazin, 1,2-diaminoethan nebo 1,3-diaminopropan.

Převedení derivátů resorufinu obecných vzorců IIa/IIb, popřípadě obecného vzorce VII s diaminy na deriváty s volnou aminoskupinou se provádí podle metod, které jsou každému odborníkovi běžné. Aby se dosáhlo zvláště vysokých výtěžků monosubstituovaných diaminů, uvádějí se do reakce takové diaminy, které mají pouze jednu reaktivní aminoskupinu a jejichž druhá funkční skupina je blokována chránicí skupinou. Zásadně jsou použitelné všechny obvyklé chránicí skupiny aminoskupiny, které se mohou znovu odštěpit bez nepříznivého vlivu na amidickou vazbu. Jako zvláště výhodné se ukázalo použití terc. butoxykarbonylové chránicí skupiny nebo benzyloxycarbonylové chránicí skupiny.

Po reakci diaminů s jednou chráněnou aminoskupinou s deriváty resorufinu obecných vzorců IIa/IIb, popřípadě VII se případně zavedené chránicí skupiny znovu odštěpí a popřípadě se leukobarvivo vzniklé jako meziprodukt oxiduje na resorufinový systém. Odštěpení chránicí skupiny aminoskupiny z navázaného diaminu se přitom provádí za obvyklých podmínek, výhodně působením trifluoroctové kyseliny.

Takto získané deriváty resorufinu obsahující aminoskupiny se mohou konjugovat obvyklým způsobem s ligandy nebo s analogy ligandů obecného vzorce III, které obsahují jako reaktivní skupiny X^2 karboxylové skupiny. Výhodně se mají tyto karboxylové skupiny aktivovat. Tato aktivace se může provádět shora popsaným způsobem. Výhodně je použití ligandů popřípadě analogů ligandů obecného vzorce III, ve kterém X^2 znamená aktivované esterové skupiny.

Jako zvláště výhodné se ukázaly především N-hydroxysukcinimidestery. Konjugace sama se provádí zásadně analogicky podle způsobu, který byl popsán pro přímou konjugaci derivátů resorufinu s ligandy nebo s analogy ligandů a přihlédnutím k zaměněným úlohám funkčních skupin.

Další reakce produktů, které se získají po kopulaci derivátů resorufinu obecných vzorců IIa/IIb, popřípadě obecného vzorce VII s mezimístkem obecného vzorce IV, tj. X^3-M-X^4 , s nízkomolekulárními ligandy X^2-A , například s hapteny, se provádí výhodně ve směsi vody nebo pufru a rozpouštědla rozpustného ve vodě, jako například 1,4-dioxanu, methanolu nebo ethanolu. Výhodně se používá směsí 0,1M roztoku kaliumfosfátového pufru o pH 8,5 a 1,4-dioxanem v poměru 1:1. Je rovněž možné sledovat průběh reakce chromatografií na tenké vrstvě. Reakce může trvat mezi 1 a 24 hodinami, většinou je však již po 1 až 18 hodinách zcela ukončena.

Pro reakci derivátů resorufinu obecných vzorců IIa/IIb, popřípadě obecného vzorce VII nebo obecných vzorců VIIa/VIIb, s vysokomolekulárními ligandy obecného vzorce III, se jako zvláště výhodné ukázaly N-hydroxysukcinimidestery. Tak postačí například při kopulaci na králičí IgG již 6 mol derivátu resorufinu na 1 mol IgG, aby se dosáhl stupeň značení 3 molekul resorufinu na 1 mol IgG. Fluorescenční barviva, která byla dosud obvyklá pro tento účel, a která mají maximální vlnovou délku absorpce $\lambda_{\max} > 470$ nm, obsahující jako reaktivní skupinu isothiokyanátový zbytek nebo zbytek chloridu sulfonové kyseliny, jako například fluoresceinisothiokyanát nebo texasská červen, se musí za účelem kopulace na králičí IgG používat v podstatně vyšším nadbytku barviva, aby se dosáhlo stejného stupně značení.

Konjugace vysokomolekulárních sloučenin obecného vzorce III, jako například bílkovin, se provádí v pufru, zvláště výhodně v 0,1M roztoku kaliumfosfátového pufru o pH 8,0 až 9,0, jestliže reaktivní skupinou X^1 nebo X^2 je N-hydroxysukcinimidester. Reakční teplota má vždy činit 10 až 35 °C. Výhodně se reakce provádí při teplotě místnosti.

Na základě zvláště příznivých spektrálních vlastností se předložený vynález rovněž týká použití sloučenin obecného vzorce Ia a Ib při analytických postupech, při kterých se zjišťuje popřípadě měří fluorescenční vlastnost sloučenin obecného vzorce Ia/Ib, popřípadě produktů přeměny těchto sloučenin v závislosti na použitém způsobu přípravy.

Při heterogenních imunoanalýzách je zapotřebí rozdělení ligandů vázaných na protilátka a volných ligandů srážením vhodnými látkami nebo použitím protilátek vázaných na pevné nosiče dříve než se stanovuje buď koncentrace volných ligandů nebo koncentrace vázaných ligandů. Při homogenních imunoanalýzách se stanovení komplexní vazby protilátka-ligand ve vzorku provádí bez takového rozdělování. K metodám homogenní imunoanalýzy počítáme například fluorescenční imunoanalýzy s řízeným zastavením reakce, fluorescenční imunoanalýzy s použitím pomocných prostředků, jakož i fluorescenční polarizační metody, při nichž se používá jako značkovacích prostředků fluorescenčních látek. Zvláště posléze uvedená metoda postrádá dosud vzhledem k nevýhodám používaných upotřebitelných fluorescenčních značkovacích prostředků, které byly popsány v úvodu, vhodné značkovací prostředky. Vzhledem k tomu, že sloučeniny obecných vzorců Ia nebo Ib mají absorpční maxima a emisní maxima, která leží výsoce nad maximy biologického materiálu, která

působí rušivě v tělních tekutinách v důsledku své vlastní fluorescence, jsou zvláště vhodné pro použití při fluorescenční polarizační imunoanalýze. Další výhodou sloučenin vyráběných postupem podle vynálezu spočívá v tom, že při vhodné substituci mají zvláště vysoký Stokesův posun až do asi 70 nm.

Fluorescenční polarizační imunoanalýza je zásadně založena na principu obvyklé fluorescenční imunoanalýzy.

Jestliže se vhodné fluorescenčně značené ligandy aktivují za účelem fluorescence lineárně polarizovaným světlem, pak molekula může vzhledem k nepatrnému časovému zpomalení mezi aktivací a emisí - dříve než začne emitovat záření - rotovat. Tím se pootočí rovina lineárně polarizovaného světla rovněž o určitý úhel. U řady molekul může během tohoto krátkého časového intervalu docházet rotační difuzí k určité depolarizaci fluorescenční emise. Pro polarizaci emitované fluorescence platí, že je o to vyšší, oč větší je molekula, a v důsledku toho čím pomalejší je rotace. Tento vzájemný vztah lze využít pro měření vazby ligandů na protilátky, protože volné, značené ligandy mají menší objem molekuly než komplexy značených ligandů navázaných na protilátku. Obráceně je pak polarizace proporcionální vůči koncentraci ligandů, která se stanovuje a která je přítomna ve vzorku.

Koncentrace značených ligandů nebo analogů ligandů a protilátky, které je zapotřebí pro takovéto imunologické postupy, se řídí podle použitého měřicího zařízení, jakož i podle příslušných charakteristických vlastností použitého značeného ligandu nebo značeného analogu ligandu a samotné protilátky. Zásadně závisí tyto koncentrace přirozeně také na koncentraci určovaného ligandu a musí se tudíž empiricky zjišťovat. Tato zjištění může každý odborník provést jednoduchou optimalizací.

Koncentrace ligandu, která se má určit, kolísá obecně od asi 10^{-2} až do asi 10^{-13} M. Je výhodné, jestliže se pro měření upraví koncentrace ligandu ve stanovovaném vzorku od asi 10^{-3} do asi 10^{-12} M, zvláště výhodně od asi 10^{-4} do asi 10^{-10} M. Vyšší koncentrace ligandu se mohou měřit po zředění původního vzorku.

Měření se provádí při určitých hodnotách pH, které mohou dosahovat od asi 3 až do asi 12. Obvykle se pohybují v rozmezí od asi 5 až do asi 10, výhodně v rozsahu pH od asi 6 do asi 9. K dosažení a udržování hodnoty pH během měření se mohou používat různé pufrы, jako například borátový pufr, fosfátový pufr, karbonátový pufr nebo Tris-pufr. Pro předložený vynález není rozhodující jaký pufr se použije. Výběr se řídí především použitou protilátkou, podle ligandu, který se má stanovovat, jakož i podle použitého fluorescenčního značkovacího prostředku.

Fluorescenční polarizační imunoanalýzy se provádějí výhodně při konstantní teplotě. Obvykle lze volit teplotu v rozsahu od asi 0 do 50 °C, výhodně v rozsahu od asi 10 do asi 40 °C.

Přesný vzájemný vztah mezi polarizací a koncentrací ligandu nebo analogu ligandu, který se stanovuje, lze vždy odečíst z kalibrační křivky. Takové křivky se získají tím, že se změří hodnoty polarizace roztoků látek a rozdílnými avšak známými koncentracemi. Neznámé koncentrace ligandů ve zkoumaném vzorku se pak mohou při znalosti polarizace zjistit z takovýchto kalibračních křivek.

Širokou oblast použití sloučenin obecných vzorců Ia a Ib, které se vyrábějí postupem podle vynálezu, nutno spatřovat v jejich obecné použitelnosti jakožto fluorescenčního značkovacího prostředku. Tak se mohou například pro imuno fluorescenční mikroskopii učinit viditelnými pomocí fluorescenčně značených protilátek jakožto antigeny bílkoviny nebo celé buňky. Odpovídajícím způsobem lze rovněž přímo pozorovat rozdělení haptenu nebo antigenu v buňce, jestliže se do buňky přivede příslušná fluorescenčně značená sloučenina, a sleduje se například pod mikroskopem. Přitom se -

na rozdíl od shora popsaných fluorescenčních imunanalýz - nemění fluorescenční vlastnosti derivátů resorufinu.

Známými barvivy, která byla dosud používána jako fluorescenční značkovací prostředky, jsou například fluoresceiny, jako fluoresceinisothiokyanát nebo rhodaminová barviva, jako texasská červen. Jak již bylo dříve uvedeno, mají však fluoresceiny tu nevýhodu, že fluoreskují při relativně nízkých vlnových délkách. Kromě toho je výtěžnost kopulační reakce podle zkušenosti na příslušný nosič většinou nízká a navíc je barevná stálost kopulačních produktů špatná. Totéž platí i pro rhodaminová barviva.

Právě s ohledem na tyto produkty vykazují sloučeniny podle vynálezu obecných vzorců Ia a Ib zřetelné výhody oproti fluorescenčním značkovacím prostředkům, které jsou známé ze stavu techniky. Fluoreskují v rozsahu dlouhých vln při dobré barevné stálosti a dají se vyrábět v dobrém výtěžku ze sloučenin obecných vzorců IIa nebo IIb a odpovídajících kopulačních složek.

Sloučeniny obecného vzorce IIa nebo IIb, které se připravují postupem podle vynálezu, se dají přirozeně používat také ke značení látek při jiných nebo uvedených fluorescenčních imunologických postupech. Tak je pomocí těchto látek možné také značení složky jiného komplexotvorného systému za použití těchto reaktivních derivátů resorufinu. Pod komplexotvornými systémy se přitom mohou rozumět všechny ty kombinace látek, které jsou na základě specifického výměnného účinku schopny tvořit komplexy. Známými kombinacemi jsou například kombinace hormonu a specifického receptoru, kombinace biotinu a avidinu, kombinace derivátu glycidu a lectinu atd. Jako příklad je možno uvést bílkoviny značené biotinem, které lze stanovit pomocí kopulačního produktu avidinu a reaktivní sloučeniny obecného vzorce IIa nebo IIb. Další výhodná použitelnost sloučenin obecného vzorce Ia a Ib, vyráběných postupem podle vynálezu, spočívá ve stanovení složky systému lectin/derivát glycidu.

Ke třídění buněk v "Fluorescent Activated Cell Sorter" se používá fluorescenčně značených částic latexu. Takovéto částice se mohou rovněž velmi dobře fluorescenčně značit, například reakcí částic latexu obsahujících hydroxylové skupiny, merkaptoskupiny, aminoskupiny nebo také karboxylové skupiny nebo sulfoskupiny, s reaktivními deriváty resorufinu obecných vzorců IIa nebo IIb.

Sloučeniny obecných vzorců Ia a Ib se dají rovněž výhodně používat ke stanovování enzymů. Za tím účelem se může vázat derivát resorufinu obecného vzorce IIa nebo IIb na substrát, který lze štěpit pomocí stanovovaného enzymu. Také tento kopulační produkt je představován sloučeninou obecného vzorce Ia a Ib, připravovanou postupem podle vynálezu. Po reakci substrátu, který je značen resorufinem, s enzymem a po oddělení štěpných produktů a nezreagovaného substrátu, lze určit aktivitu enzymu. Tak například lze vázat reaktivní derivát resorufinu obecného vzorce IIa nebo IIb na glykopeptid a takto získaný kopulační produkt lze potom použít jako substrát pro důkaz účinnosti endoglukosidázy. Ke stanovení endoglukosidáz je známé značení pomocí derivátů dansylu (srov. Iwase a další, Anal. Biochem. 113, 93-95 (1981)). Deriváty resorufinu se ve srovnání s těmito sloučeninami vyznačují zvláště svou vyšší citlivostí.

Následující příklady slouží k objasnění vynálezu. Tyto příklady, které rozsah vynálezu v žádném směru neomezují, mají ukázat zásadní možnost značení nízkomolekulárních a vysokomolekulárních sloučenin a jejich použití.

Příklad 1

/3-(1-difenylyhydantoinyl)ethylkarbonyl/piperazid resorufin-4-karboxylové kyseliny

a) Resorufin-4-karboxylová kyselina

16 g nitrosoresorcinu, 15,5 g 2,6-dihydroxybenzoové kyseliny a 8,6 g oxidu manganického (burelu) se suspenzuje ve 200 ml methanolu a pak se suspenze ochladí na 0 °C. K takto ochlazené suspenzi se přikape 10,6 ml koncentrované kyseliny sírové a reakční směs se míchá potom ještě 2 hodiny při teplotě místnosti. Vyloučená červená resazurin-4-karboxylová kyselina se odfiltruje, promyje se methanolem a vysuší se.

Derivát resazurinu se rozpustí ve 200 ml vody a 50 ml 25% roztoku amoniaku a získaný roztok se zfiltruje. K modrému filtrátu se přidá za chlazení ledem po částech 50 g práškového zinku a směs se nechá zahřát na teplotu místnosti. Průběh redukce se dá snadno sledovat chromatografií na tenké vrstvě (rozpouštědlový systém: směs methanolu a ethylacetátu v poměru 1:1; silikagelové desky pro chromatografii na tenké vrstvě). Reakční roztok se zfiltruje, filtrát se potom okyslí ledovou kyselinou octovou a malým množstvím koncentrované chlorovodíkové kyseliny. Vyloučená resorufin-4-karboxylová kyselina se odfiltruje a vysuší se ve vakuu oxidem fosforečným.

Výtěžek: 16,33 g

R_F (silikagel; rozpouštědlový systém: směs n-butanolu, ledové kyseliny octové a vody v poměru 4:1:1)

= 0,4.

b) N,O,O-triacetyldihydroresorufin-4-karboxylová kyselina

12,9 g resorufin-4-karboxylové kyseliny se rozpustí ve 30 ml ledové kyseliny octové a 30 ml acetanhydridu, přidá se 27,6 g chloridu cínatého a směs se míchá 1 hodinu při teplotě 80 °C. Směs se vylije do 600 ml ledové vody, pak se míchá po dobu 1 hodiny a sraženina se odfiltruje. Po vysušení se pevná látka vyjme 500 ml acetonu. Roztok se zfiltruje a filtrát se odpaří. Po vysušení se získá 11,3 g produktu.

¹H-NMR spektrum (perdeuterovaný dimethylsulfoxid):

δ = 2,24, 2,26 a 2,29 (vždy s, 9H);
6,94 (dvojitý d, J = 8,5 a 2,2 Hz, 1H);
6,98 (d, J = 2,2 Hz, 1H);
7,04 (d, J = 9 Hz, 1H);
7,61 (d, J = 8,5 Hz, 1H);
7,67 ppm (d, J = 9 Hz, 1H).

Hodnota R_F = 0,46

/silikagel, rozpouštědlový systém:

směs chloroformu, methanolu a ledové kyseliny octové v poměru 9:1:0,1/.

c) Chlorid N,O,O-triacetyldihydroresorufin-4-karboxylové kyseliny

38,5 g triacetátu popsaného v příkladu 1b) se smísí s přísadkou 54 ml oxalylchloridu a směs se ochladí na teplotu 0 °C. K této směsi se přidá několik kapek dimethylformamidu a směs se nechá zahřát na teplotu místnosti. Edukt se přitom rozpouští za vývinu plynu. Směs se odpaří za sníženého tlaku k suchu, zbytek se vyjme vždy třikrát 200 ml absolutního methylenchloridu a methylenchloridový roztok se znovu odpaří k suchu.

Výtěžek: 41 g.

d) N-terc butoxykarbonylpiperazin

12,61 g N-benhydrylpiperazinu se rozpustí ve 100 ml směsi 1,4-dioxanu a vody v poměru 3:1. K tomuto roztoku se přikape roztok 12,0 g di-terc.butyldikarbonátu rozpouštěného v 50 ml 1,4-dioxanu. Po 1/2 hodině míchání se ke směsi přikape 50 ml vody, směs se zfiltruje a sraženina se vysuší.

Výtěžek: 16,2 g N-terc.butoxykarbonyl-N'-benzhydrylpiperazinu

Hodnota R_F = 0,92

(silikagel, rozpouštědlový systém:

směs chloroformu, methanolu a ledové kyseliny octové v poměru 9:1:0,1).

7 g N-terc.butoxykarbonyl-N'-benzhydrylpiperazinu se rozpustí ve 100 ml ethylacetátu a 5 ml ledové kyseliny octové. Přidá se 0,3 g paladia na aktivním uhlí a provede se hydrogenace. Potom se katalyzátor odfiltruje a filtrát se odpaří. Ke zbytku se přidá 100 ml vody a 20 ml 1N roztoku chlorovodíkové kyseliny a směs se zfiltruje. Filtrát se dvakrát extrahuje ethylacetátem a potom se vodná fáze zalkalizuje hydroxidem sodným. Produkt, který se vyloučí v olejovité formě, se extrahuje dichlormethanem. Po vysušení síranem sodným a po odpaření se získá 3,2 g N-terc.butoxykarbonyl-piperazinu ve formě oleje, který po několika dnech úplně vykrystaluje.

Hodnoty R_F = 0,05

(silikagel, rozpouštědlový systém:

směs chloroformu, methanolu a ledové kyseliny octové v poměru 9:1:0,1).

Při použití ninhydrinu vzniká modré zbarvení.

e) N'-terc.butoxykarbonylpiperazid N,O,O-triacetyl-dihydroresorufin-4-karboxylové kyseliny

K 25 g chloridu kyseliny, který je popsán v příkladu 1 c), a 17,3 g triethylaminu ve 450 ml dichlormethanu se při teplotě 0 °C přikape roztok 13,8 g N-terc.butoxykarbonylpiperazinu v 50 ml dichlormethanu. Reakční směs se míchá bez chlazení po dobu 1 hodiny, třikrát se extrahuje vodou a organická fáze se odpaří.

Výtěžek: 36,0 g.

Hodnota R_F = 0,64

(silikagel, rozpouštědlový systém:

směs chloroformu, methanolu a ledové kyseliny octové v poměru 9:1:0,1).

f) N'-terc-butoxykarbonylpiperazin N-acetyldihydroresorufin-4-karboxylové kyseliny

34,3 g triacetátu, který je popsán v příkladu 1e) a 17,1 g sířičitanu sodného se míchá 1 hodinu při teplotě 60 °C v 500 ml směsi 1,4-dioxanu a vody v poměru 1:1. Potom se reakční směs odpaří, zbytek se vyjme ethylacetátem, ethylacetátový roztok se zfiltruje za účelem odstranění nerozpustných solí a chromatografuje se na 2 litrech silikagelu (eluční činidlo: směs ethylacetátu a dichlormethanu v poměru 4:1, jakmile se začne vymývat produkt přemění se na čistý ethylacetát).

Výtěžek: 14 g.

Hodnota R_F = 0,28 (silikagel, rozpouštědlový systém:

směs ethylacetátu a dichlormethanu v poměru 4:1).

g) N'-terc.butoxykarbonylpiperazid resorufin-4-karboxylové kyseliny

5 g N-acetylderivátu popsaného v příkladu 1f) se rozpustí ve 200 ml methanolu a 600 ml vody. K získanému roztoku se přidá 1,8 g natriumhydrogenuhličitanu sodného a 10,7 ml 1N roztoku hydroxidu sodného a potom 14 g hexakynoželezitanu draselného. Po 1/2 hodině míchání při teplotě místnosti se hodnota pH upraví na 5. Produkt se vyloučí a odfiltruje se.

Výtěžek: 2,72 g.

Hodnota R_F = 0,28 (silikagel, rozpouštědlový systém:

směs chloroformu, methanolu a ledové kyseliny octové v poměru 9:1:0,1).

h) Trifluoracetát resorufin-4-karboxylové kyseliny

1 g terc.butoxykarbonylderivátu popsaného v příkladu 1g) se ponechá stát 15 minut ve 20 ml trifluoroctové kyseliny. Roztok se odpaří, zbytek se digeruje s etherem a produkt se odfiltruje.

Výtěžek: 0,96 g.

Hodnota R_F = 0,92 (silikagel, rozpouštědlový systém:

směs chloroformu, methanolu a ledové kyseliny octové v poměru 9:1:0,1).

i) Kopulace piperazidu resorufin-4-karboxylové kyseliny s N-hydroxysukcinimidesterem 3-(1-difenylhydantoinyl)-propionové kyseliny

191 mg trifluoracetátu piperazidu popsaného v příkladu 1h) a 210 mg N-hydroxysukcinimidesteru 3-(1-difenylhydantoinyl)propionové kyseliny (přípraveného ze sodné soli difenylhydantoinu a ethylesteru 3-brompropionové kyseliny analogicky podle postupu, který popsal Cooc a další, Res. Communications in Chemical Pathology and Pharmacology 2 (1973), str. 767) se míchá po dobu 15 hodin ve 20 ml dioxanu a 20 ml 0,1M roztoku kaliumfosfátového pufru o pH 8,5. Vyloučený produkt se odfiltruje, filtrát se odpaří a odparek se chromatografuje na silikagelu (RP18) za použití isopropylalkoholu jako elučního činidla, přičemž se získá další část produktu. Produkt se překrystaluje ze směsi ethylacetátu a methanolu a získá se celkem 250 mg kopulačního produktu.

Hodnota R_F = 0,61 (silikagel, rozpouštědlový systém:

směs chloroformu, methanolu a ledové kyseliny octové v poměru 9:1:0,1).

$^1\text{H-NMR}$ spektrum (perdeuterovaný dimethylsulfoxid):

δ = 2,6 - 2,8 (m, 2H); 3,0 - 3,8 (m, 10H);
 6,74 (d, J = 2,2 Hz, 1H);
 6,82 (d, J = 9,5 Hz, 1H);
 6,91 (dvojitý d, J = 9,5 a 2,2 Hz);
 7,25 - 7,33 (m, 10H);
 7,55 a 7,66 ppm (vždy d, J = 9,5 Hz, 2H).

UV/VIS (0,1M kaliumfosfátový pufr pH 7,5):

λ_{max} = 576,8 nm.

Fluorescenční emise: λ_{max} = 592 nm.

Příklad 2

Kopulace piperazidu resorufin-4-karboxylové kyseliny s N-hydroxysukcinimidoesterem 3-(1-difenylhydantoinyl)octové kyseliny

Analogickým postupem jako je popsán v příkladu 1i) se z 365 mg trifluoracetátu piperazidu resorufin-4-karboxylové kyseliny a 339 mg N-hydroxysukcinimidesteru 3-(1-difenylhydantoinyl)octové kyseliny získá 210 mg žádaného produktu.

Hodnota R_f = 0,82 (silikagel, rozpouštědlový systém:

směs n-butanolu, ledové kyseliny octové a vody v poměru 4:1:1).

$^1\text{H-NMR}$ spektrum (perdeuterovaný dimethylsulfoxid):

δ = 3,2 - 4,5 (m, 10H); 6,60 (d, J = 2,4 Hz, 1H); 6,71 (d, J = 9,5 Hz, 1H);
6,80 (dvojitý d, J = 9,05 a 2,4 Hz, 1H); 7,39 ("s", 10H);
7,52 (d, J = 9,5 Hz, 1H); 7,61 (d, J = 9,0 Hz, 1H); 9,65 ppm (s, 1H).

UV/VIS (0,1M roztok kaliumfosfátového pufru, pH 8,0):

λ_{max} = 575,4 nm

Fluorescenční emise:

λ_{max} = 592 nm.

Příklad 3

Kopulace piperazidu resorufin-4-karboxylové kyseliny s N-hydroxysukcinimidoesterem N-terc.butoxykarbonyl-L-thyroxinu

Analogickým postupem jako je popsán v příkladu 1i) se z 212 mg trifluoracetátu piperazidu resorufin-4-karboxylové kyseliny a 419 mg N-hydroxysukcinimidesteru N-terc.butoxykarbonyl-L-thyrosinu získá 320 mg produktu.

Hodnota R_f = 0,58 (silikagel, rozpouštědlový systém:

směs chloroformu, methanolu a ledové kyseliny octové v poměru 9:1:0,1).

N-Hydroxysukcinimidester N-terc.butoxykarbonyl-thyroxinu se získá následujícím způsobem:

a) N-terc.butoxykarbonylthyroxin

Roztok 10 g (12,5 mmol) monohydrátu sodné soli L-thyroxinu ve směsi 300 ml diioxanu a vody v poměru 2:1 a 15 ml 1N roztoku hydroxidu sodného se smísí s přísadkou 3 g (13,75 mmol) di-terc.butyldikarbonátu $(\text{BOC})_2\text{O}$ a směs se míchá při teplotě místnosti za vyloučení světla.

Přidáním 2M roztoku kyseliny chlorovodíkové se hodnota pH upraví na 2, provede se extrakce ethylacetátem, ethylacetátový extrakt se promyje vodou, vysuší se síranem sodným a odpaří se. Pevný zbytek se rozetře a petroletherem, suspenze se zfiltruje a produkt se vysuší v exsikkátoru.

Výtěžek: 9,45 g = 86 % teorie.

Hodnota R_f = 0,6 (silikagel, rozpouštědlový systém:

směs chloroformu, ligroinu a octové kyseliny v poměru 6:3:1).

b) N-hydroxysukcinimidester N-BOC-thyroxinu

K roztoku 8,8 g L-BOC-thyroxinu ve 200 ml ethylenglykoldimethyletheru se přidá 1,2 g (9,5 mmol) N-hydroxysukcinimidu. Roztok se ochladí na 10 °C a potom se k němu přikape roztok 2,3 g (9,9 mmol) dicyklohexylkarbodiimidu ve 40 ml ethylenglykoldimethyletheru. Po 2 hodinách míchání při teplotě místnosti se vyloučená dicyklohexylmočovina

odfiltruje a filtrát se odpaří za sníženého tlaku při teplotě 40 °C. Zbytek se roztírá s isopropylalkoholem a suspenze se zfiltruje. Produkt se vysuší v exsikátoru při teplotě místnosti.

Výtěžek: 9,19 g = 94 % teorie (celkový výtěžek, vztaženo na tyroxin = 81 %).

Hodnota R_f = 0,6

(vysocučinná kapalinová chromatografie HPTLC-RP 18; rozpouštědlový systém: směs acetonitrilu a vody v poměru 8:2).

$^1\text{H-NMR}$ spektrum (perdeuterovaný dimethylsulfoxid):

δ = 1,36 (s, 9H); 2,81 (s, 4H); 2,9 - 3,2 (m, 2H); 4,5 - 4,9 (m, 1H); 7,03 (s, 2H); 7,63 (d, J = 9 Hz, 1H); 7,90 (s, 2H); 9,2 (s, 1H).

Příklad 4

Kopulace piperazidu resorufin-4-karboxylové kyseliny s 3-O- β -(N-sukcinimidooxykarbonyl)propyl/estradiolem

Analogickým postupem jako je popsán v příkladu 1i) se z 212 mg trifluoracetátu resorufin-4-karboxylové kyseliny a 220 mg 3-O- β -(N-sukcinimidooxykarbonyl)propyl/estradiolu získá 295 mg produktu.

Hodnota R_f = 0,58 (silikagel, rozpouštědlový systém:

směs chloroformu, methanolu a ledové kyseliny octové v poměru 9:1:0,1).

3-O- β -(N-sukcinimidooxykarbonyl)propyl/estradiol se získá obvyklým způsobem z 3-O-karboxypropylestradiolu (z estradiolu a bromásečné kyseliny analogicky podle postupu, který popsali Lübke a další v Immunologische Tests für niedermolekulare Wirkstoffe, G. Thieme Verlag, Stuttgart, str. 94) a N-hydroxysukcinimidu v přítomnosti dicyklohexylkarbodiimidu.

Příklad 5

Kopulace piperazidu resorufin-4-karboxylové kyseliny s N- β -(N-sukcinimidooxykarbonyl)propyl/fenobarbitalem

Analogickým postupem jako je popsán v příkladu 1i) se z 212 mg trifluoracetátu piperazidu resorufin-4-karboxylové kyseliny a 205 mg N- β -(N-sukcinimidooxykarbonyl)propyl/fenobarbitalu získá 220 mg produktu.

Hodnota R_f = 0,45 (silikagel, rozpouštědlový systém:

směs chloroformu, methanolu a ledové kyseliny octové v poměru 9:1:0,1).

N- β -(N-sukcinimidooxykarbonyl)propyl/fenobarbital se získá obvyklým způsobem z fenobarbital-1-másečné kyseliny (T. Nistikawa a další, Clin. Chim. Acta 91 (1979), str. 59) a N-hydroxysukcinimidu v přítomnosti dicyklohexylkarbodiimidu.

Příklad 6

Kopulace piperazidu resorufin-4-karboxylové kyseliny s N-hydroxysukcinimidesterem theofylin-7-propionové kyseliny

Z 212 mg trifluoracetátu piperazidu resorufin-4-karboxylové kyseliny a 175 mg N-hydroxysukcinimidesteru theofylin-7-propionové kyseliny se získá analogickým postupem jako je popsán v příkladu 1i) 200 mg produktu.

Hodnota $R_F = 0,44$ (silikagel, rozpouštědlový systém:

směs chloroformu, methanolu a ledové kyseliny octové v poměru 9:1:0,1).

N-Hydroxysukcinimidester theofylin-7-propionové kyseliny se získá obvyklým způsobem z theofylin-7-propionové kyseliny (T. Nistikawa a další. Chem. Pharm. Bull. 27 (1979) str. 893) a N-hydroxysukcinimidu v přítomnosti dicyklohexylkarbodiimidu.

Příklad 7

Kopulace N'-hydroxysukcinimidesteru N-(4-resorufinylkarbonyl)sarkosinu s 1-(2-aminoethyl)difenylhydantoinem

a) (terc.butoxykarbonylmethyl)methylamid N,O,O-triacetyldihydroresorufin-4-karboxylové kyseliny

10 g chloridu kyseliny, který je popsán v příkladu 1c), se nechá reagovat analogickým způsobem jako v příkladu 1e) s terc. butylesterem sarkosinu.

Výtěžek: 7,5 g.

Hodnota $R_F = 0,77$ (silikagel, rozpouštědlový systém:

směs chloroformu, methanolu a ledové kyseliny octové v poměru 9:1:0,1).

b) (terc.butoxykarbonylmethyl)methylamid N-acetyldihydroresorufin-4-karboxylové kyseliny

7,5 g produktu, který je popsán v příkladu 7a), se analogickým postupem jako je popsán v příkladu 1f) deacetyluje.

Výtěžek: 5,2 g.

Hodnota $R_F = 0,56$ (silikagel, rozpouštědlový systém:

směs chloroformu, methanolu a ledové kyseliny octové v poměru 9:1:0,1).

c) (terc.butoxykarbonylmethyl)methylamid resorufin-4-karboxylové kyseliny

4,5 g produktu popsaného v příkladu 7b) se nechá reagovat analogickým postupem jako je popsán v příkladu 1g).

Výtěžek: 2,6 g.

Hodnota $R_F = 0,64$ (silikagel, rozpouštědlový systém:

směs chloroformu, methanolu a ledové kyseliny octové v poměru 9:1:0,1).

d) (karboxymethyl)methylamid resorufin-4-karboxylové kyseliny

0,55 g produktu popsaného v příkladu 7c) se ponechá stát v klidu 1 hodinu při teplotě místnosti v 6 ml trifluoroctové kyseliny. Potom se reakční směs odpaří k suchu, zbytek se roztírá s etherem a produkt se odfiltruje.

Výtěžek: 0,45 g.

Hodnota $R_F = 0,11$ (silikagel, rozpouštědlový systém:

směs chloroformu, methanolu a ledové kyseliny octové v poměru 9:1:0,1).

e) N'-hydroxysukcinimidester N-(4-resorufinylkarbonyl)sarkosinu

200 mg produktu z příkladu 7d) se míchá s 72 mg N-hydroxysukcinimidu a 138 mg dicyklohexylkarbodiimidu 14 hodin ve 40 ml tetrahydrofuranu. Vyloučená močovina se

odfiltruje, filtrát se odpaří a odparek se chromatografuje na silikagelu (RP 18) za použití směsi nitromethanu a ethanolu v poměru 4:1 jako elučního činidla.

Výtěžek: 150 mg

Hodnota R_F = 0,79 (silikagel RP-18, rozpouštědlový systém:
směs nitromethanu a ethanolu v poměru 4:1).

f) Kopulace N'-hydroxysukcinimidesteru N-(4-resorufinylkarbonyl)sarkosinu s 1-(2-aminoethyl)difenylhydantoinem

125 mg N-hydroxysukcinimidesteru z příkladu 7e) se míchá 1 hodinu s 90 mg 1-(2-aminoethyl)-difenylhydantoinem ve 40 ml směsi dioxanu a kaliumfosfátového pufru o pH 8,5 v poměru 1:1. Dioxan se úplně odpaří, k odparku se přidá až do úplné barevné přeměny amoniak, směs se zfiltruje a z filtrátu se přidáním chlorovodíkové kyseliny vyloučí produkt.

Výtěžek: 110 mg.

Hodnota R_F = 0,78 (silikagel, rozpouštědlový systém:
směs n-butanolu, ledové kyseliny octové a vody v poměru 4:1:1).

UV/VIS (0,1 molární roztok kaliumfosfátového pufru, pH 8,0):

$$\lambda_{\max} = 575 \text{ nm.}$$

Fluorescenční emise:

$$\lambda_{\max} = 592 \text{ nm.}$$

Příklad 8

Kopulace piperaziidu 6-methylresorufin-4-karboxylové kyseliny a N-hydroxysukcinimidesterem /2-(1-difenylhydantoinyl)/octové kyseliny

a) 2-methyl-4-nitrosoresorcin

19,8 g 2-methylresorcínu a 13,4 g hydroxidu draselného se rozpustí ve 120 ml ethanolu a roztok se ochladí na teplotu 5 °C. K takto ochlazenému roztoku se přikape 24 ml isopentylnitritu, směs se míchá 3 hodiny a sraženina se odfiltruje. Žlutá pevná látka se vmíchá do 200 ml 5N roztoku kyseliny sírové. Přitom se vyloučí světle žlutý produkt.

Výtěžek: 22 g.

Hodnota R_F = 0,53 (silikagel, rozpouštědlový systém:
směs chloroformu, methanolu a ledové kyseliny octové v poměru 9:1:0,1).

b) 6-methylresazurin-4-karboxylová kyselina

15,3 g 2-methyl-4-nitrosoresorcínu, 15,4 g 2,6-dihydroxybenzoové kyseliny, 8,8 g burelu a 11 ml koncentrované kyseliny sírové se nechá reagovat analogickým postupem jako je popsán v příkladu 1a).

Výtěžek: 28,7 g.

Hodnota R_F = 0,15 (silikagel, rozpouštědlový systém:
směs chloroformu, methanolu a ledové kyseliny octové v poměru 9:1:0,1).

c) N,O,O-triacetyl-6-methyldihydroresorufin-4-karboxylová kyselina

Z 10 g 6-methylresazurin-4-karboxylové kyseliny, 19,8 g chloridu cínatého, 20 ml acetanhydridu a 150 ml ledové kyseliny octové se získá analogickým postupem jako je popsán v příkladu 1b) přímo triacetylovaná leukosloučenina. Surový produkt se čistí vyvěšením v acetonu.

Výtěžek: 7,3 g.

Hodnota R_F = 0,51 (silikagel, rozpouštědlový systém:

směs chloroformu, methanolu a ledové kyseliny octové v poměru 9:1:0,1).

$^1\text{H-NMR}$ spektrum (perdeuterovaný dimethylsulfoxid:

= 2,10, 2,25, 2,29, 2,33 (vždy s, 12H), 7,00, 7,09, 7,50 a 7,74 ppm (vždy d, J = 8,8 Hz, 4H).

d) N'-butoxykarbonylpiperazid N,O,O-triacetyl-6-methyldihydroresorufin-4-karboxylové kyseliny

Analogickým postupem jako je popsán v příkladech 1d) až 1e) se z 5 g N,O,O-triacetyl-6-methyldihydroresorufin-4-karboxylové kyseliny, 10,7 ml oxalylchloridu a 2 g N-butoxykarbonylpiperazinu získá 3 g produktu.

Hodnota R_F = 0,57 (silikagel, rozpouštědlový systém:

ethylacetát).

e) Trifluoracetát piperazidu 6-methylresorufin-4-karboxylové kyseliny

1 g triacetylderivátu, který je popsán v příkladu 8d) se nechá reagovat analogickým způsobem jako je popsán v příkladech 1g) až 1h).

Výtěžek: 0,43 g.

f) Kopulace N-hydroxysukcinimidesteru 2-(1-difenylhydantoinyl)octové kyseliny s piperazidem 6-methylresorufin-4-karboxylové kyseliny

222 mg sloučeniny získané v příkladu 8e) se nechá reagovat s 200 mg N-hydroxysukcinimidesteru 2-(1-difenylhydantoinyl)octové kyseliny.

Výtěžek: 250 mg.

UV/VIS (0,1 molární kaliumfosfátový pufr, pH 8,0):

$$\lambda_{\max} = 584 \text{ nm.}$$

Fluorescenční emise:

$$\lambda_{\max} = 600 \text{ nm.}$$

Příklad 9

Kopulace piperazidu 9-hydroxy-5-benzo[a]fenoxazon-8-karboxylové kyseliny s N-hydroxysukcinimidesterem 2-(1-difenylhydantoinyl)octové kyseliny

a) 12-oxid 9-hydroxy-5-benzo[a]fenoxazon-8-karboxylové kyseliny

2,84 g 1,3-dihydroxy-4-nitrosonaftalenu, 2,31 g 2,6-dihydroxybenzoové kyseliny, 1,29 g burelu a 1,6 ml koncentrované kyseliny sírové se nechá reagovat analogickým postupem jako je popsán v příkladu 1a).

Výtěžek: 2,8 g.

Hodnota R_F = 0,63 (silikagel, rozpouštědlový systém:

směs n-butanolu, ledové kyseliny octové a vody v poměru 4:1:1).

b) 12-acetyl-5,9-diacetoxybenzo[e]fenoxazon-8-karboxylová kyselina

Analogickým postupem jako je popsán v příkladu 8c) se z 2,4 g 12-oxidu 9-hydroxy-5-benzo[e]fenoxazon-8-karboxylové kyseliny získá 1,8 g triacetylované dihydrosloučeniny.

Hodnota R_F = 0,31 (silikagel, rozpouštědlový systém:

směs chloroformu, methanolu a ledové kyseliny octové v poměru 9:1:0,1).

c) N'-butoxykarbonylpiperazid 12-acetyl-5,9-diacetoxybenzo[e]fenoxazin-8-karboxylové kyseliny

1,6 g triacetylderivátu popsaného v příkladu 9b) se nechá reagovat analogickým postupem jako je popsán v příkladu 8d) s oxalylchloridem a N-butoxykarbonylpiperazinem.

Výtěžek: 1,2 g.

$^1\text{H-NMR}$ spektrum (deuterochloroform):

δ = 1,49 (s, 9H), 2,12, 2,27, 2,46 (vždy s, 12H), 3,0 - 3,9 (m, 8H), 7,03 (d, J = 9 Hz, 1H), 7,16 - 7,94 ppm (m, 6H).

d) N'-butoxykarbonylpiperazid 9-hydroxy-5-benzo[a]-fenoxazon-8-karboxylové kyseliny

Analogickým postupem jako je popsán v příkladu 1f) se z 0,93 g triacetylderivátu z příkladu 9c) získá 0,51 g produktu.

Hodnota R_F = 0,69 (silikagel, rozpouštědlový systém:

směs chloroformu, methanolu a ledové kyseliny octové v poměru 9:1:0,1).

e) Trifluoracetát piperazidu 9-hydroxy-6-benzo[a]-fenoxazon-8-karboxylové kyseliny

Z 0,5 g butoxykarbonyl-chráněné sloučeniny popsané v příkladu 9d) se analogickým postupem jako je popsán v příkladu 1h) získá 0,5 g produktu.

Hodnota R_F = 0,02 (silikagel, rozpouštědlový systém:

směs chloroformu, methanolu a ledové kyseliny octové v poměru 9:1:0,1).

f) Kopulace piperazidu 9-hydroxy-5-benzo[a]fenoxazon-8-karboxylové kyseliny s N-hydroxysukcinimidesterem 2-(1-difenylhydantoinyl)octové kyseliny

Z 50 mg piperazidu, který byl připraven podle příkladu 9e) a 150 mg N-hydroxysukcinimidesteru 2-(1-difenylhydantoinyl)octové kyseliny se analogickým postupem jako je popsán v příkladu 1i) získá 70 mg produktu.

Hodnota R_F = 0,57 (silikagel, rozpouštědlový systém:

směs chloroformu, methanolu a ledové kyseliny octové v poměru 9:1:0,1).

UV/VIS (0,1 molární roztok kaliumfosfátového pufru, pH 8,0):

λ_{max} = 560 nm

Fluorescenční emise:

λ_{max} = 615 nm.

$^1\text{H-NMR}$ spektrum (perdeuterovaný dimethylsulfoxid):

δ = 3,0 - 4,5 (m, 10H), 6,37 (s, 1H), 6,80 (d, J = 8 Hz, 1H), 7,2 - 7,35 (m, 10H), 7,35 - 8,0 (m, 3H), 8,10 (dvojitý d, J = 8 a 2 Hz, 1H), 8,56 (dvojitý d, J = 8 a 2 Hz, 1H), 9,60 ppm (s, 1H).

Příklad 10

(1-difenylyhydantoinylmethylkarbonyl)piperazid 8-ethylresorufin-4-karboxylové kyseliny
a) 6-ethyl-4-nitrosoresorcin

Analogickým postupem jako v příkladu 8a) se z 7,5 g 4-ethylresorcinu, 4,5 g hydroxidu draselného a 8 ml isopentylnitritu získá ve formě žluté pevné látky 6-ethyl-4-nitrosoresorcin.

Výtěžek: 7,5 g.

Hodnota $R_f = 0,37$ (silikagel, rozpouštědlový systém:
směs chloroformu, methanolu a ledové kyseliny octové v poměru
9:1:0,1).

b) 8-ethylresorufin-4-karboxylová kyselina

Analogickým postupem jako je popsán v příkladu 1a) se z 7,4 g 6-ethyl-4-nitrosoresorcinu, 6,8 g 2,6-dihydroxybenzoové kyseliny, 3,9 g oxidu manganititého a 5 ml koncentrované kyseliny sírové po redukci 8 g práškového zinku získá 9,5 g produktu.

Hodnota $R_f = 0,05$ (silikagel, rozpouštědlový systém:
směs chloroformu, methanolu a ledové kyseliny octové v poměru
9:1:0,1).

c) N'-butoxykarbonylpiperazid N,O,O-triacetyl-8-ethyl-dihydroresorufin-4-karboxylové kyseliny

Analogickým postupem jako je popsán v příkladu 1d) se z 7,7 g 8-ethylresorufin-4-karboxylové kyseliny, 15,4 g chloridu cínatého, 30 ml ledové kyseliny octové a 15,3 ml acetanhydridu získá N,O,O-triacetyl-8-ethylresorufin-4-karboxylová kyselina, která se jako surový produkt analogickým postupem jako je popsán v příkladu 1c) přímo dále zpracovává na chlorid kyseliny a analogickým postupem jako je popsán v příkladu 1e) se přímo dále zpracovává na butoxykarbonylpiperazid.

Výtěžek: 4 g.

Hodnota $R_f = 0,86$ (silikagel, rozpouštědlový systém:
směs chloroformu, methanolu a ledové kyseliny octové v poměru
9:1:0,1).

d) N'-butoxykarbonylpiperazid 8-ethylresorufin-4-karboxylové kyseliny

4 g N'-butoxykarbonylpiperazidu N,O,O-triacetyl-8-ethyl-dihydroresorufin-4-karboxylové kyseliny se získá analogickým postupem jako je popsán v příkladu 1f) a 1g) odpovídající N'-butoxykarbonylpiperazid karboxylové kyseliny.

Výtěžek: 0,5 g.

Hodnota $R_f = 0,67$ (silikagel, rozpouštědlový systém:
směs chloroformu a methanolu v poměru 4:1).

e) Trifluoracetát piperazidu 8-ethylresorufin-4-karboxylové kyseliny

330 mg odpovídajícího butoxykarbonylpiperazidu se nechá v klidu 1,5 hodiny ve 35 ml směsi dichlormethanu a trifluoroctové kyseliny v poměru 6:1. Po odpaření se zbytek digeruje s etherem, produkt se odfiltruje a vysuší.

Výtěžek: 350 mg.

Hodnota $R_f = 0,33$ (silikagel, rozpouštědlový systém:
směs butanolu, ledové kyseliny octové a vody v poměru 4:1:1).

f) Reakce s N-hydroxysukcinimidesterem 2-(1-difenylyhydantoinyl)octové kyseliny

Analogickým postupem jako je popsán v příkladu 1i) se z 325 mg trifluoracetátu piperazidu 8-ethylresorufin-4-karboxylové kyseliny a 435 mg N-hydroxysukcinimidesteru 2-(1-difenylhydantoinyl)octové kyseliny získá 120 mg produktu.

Hodnota $R_F = 0,43$ (silikagel, rozpouštědlový systém:

směs chloroformu, methanolu a ledové kyseliny octové v poměru 9:1:0,1).

$^1\text{H-NMR}$ (perdeuterovaný dimethylsulfoxid):

$\delta = 1,15$ (t, $J = 7,2$ Hz, 3H), 2,52 (q, $J = 7,2$ Hz, 2H), 3,1 - 4,0 (m, 8H), 4,25 - 4,45 (m, 2H), 6,42 (s, široký, 1H), 6,94 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H), 7,3 - 7,5 (m, 11H), 7,68 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H), 9,54 (s, 1H), 11,2 ppm (s, široký, 1H).

UV/VIS (0,1 molární roztok kaliumfosfátového pufru, pH = 8,0):

$\lambda_{\text{max}} = 575$ nm.

Fluorescenční emise:

$\lambda_{\text{max}} = 598$ nm.

Příklad 11

(1-difenylhydantoinylmethylkarbonyl)piperazid 8-chlorresorufin-4-karboxylové kyseliny
a) 8-chlorresazurin-4-karboxylová kyselina

Z 17,3 g 4-chlor-6-nitrosoresorcinu (přípraveného podle Plampina a Caina, J. Med. Chem. 6, 247 (1963)), 15,4 g 2,6-dihydroxybenzoové kyseliny, 8,6 g oxidu manganického a 10,7 ml koncentrované kyseliny sírové se získá analogickým postupem jako je popsán v příkladu 1a) 8-chlorresazurin-4-karboxylová kyselina.

Výtěžek: 17,1 g.

Hodnota $R_F = 0,58$ (silikagel, rozpouštědlový systém:

směs butanolu, ledové kyseliny octové a vody v poměru 4:1:1).

b) N,O,O-triacetyl-8-chlordihydroresorufinkarboxylová kyselina

16,3 g 8-chlorresazurin-4-karboxylové kyseliny a 18,9 g chloridu cínatého se zahřívá 1/2 hodiny ve 100 ml směsi ledové kyseliny octové a acetenhydridu v poměru 1:1 na teplotu 80 °C a potom se směs vylije do 500 ml vody ochlazené ledem. Reakční směs se míchá 2 hodiny, potom se zfiltruje za účelem odstranění sraženiny a vysuší se pomocí prostředku "Sicapent^R". Pevná látka se vyjme 500 ml acetonu a nerozpustné zbytky se odfiltrují. Filtrát se odpaří a po vysušení se získá 12,3 g produktu.

Hodnota $R_F = 0,39$ (silikagel, rozpouštědlový systém:

směs chloroformu, methanolu a ledové kyseliny octové v poměru 9:1:0,1).

$^1\text{H-NMR}$ spektrum (perdeuterovaný dimethylsulfoxid):

$\delta = 2,25$ (s, 3H), 2,33 ("s", 6H), 7,16 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H), 7,30 (s, 1H), 7,76 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H), 7,90 ppm (s, 1H).

c) N'-butoxykarbonylpiperazid 8-chlorresorufin-4-karboxylové kyseliny

Analogickým postupem jako v příkladu 1b), c) a e) až g) se získá z 5 g N,O,O-triacetyl-8-chlordihydroresorufin-4-karboxylové kyseliny 0,8 g produktu.

Hodnota $R_F = 0,7$ (silikagel, rozpouštědlový systém:

směs chloroformu, methanolu a ledové kyseliny octové v poměru 9:1:0,1).

d) Trifluoracetát piperazidu 8-chlorresorufin-4-karboxylové kyseliny

Z 0,8 g butoxykarbonyl-chráněné sloučeniny z příkladu 11e) se získá 0,81 g produktu analogickým postupem jako je popsán v příkladu 1h).

Hodnota R_f = 0,07 (silikagel, rozpouštědlový systém:

směs chloroformu, methanolu a ledové kyseliny octové v poměru 9:1:0,1).

e) Kopulace piperazidu 8-chlorresorufin-4-karboxylové kyseliny s N-hydroxysukcinimidesterem 2-(1-difenylyhydantoinyl)octové kyseliny

Analogickým postupem jako je popsán v příkladu 1i) se z 400 mg trifluoracetátu piperazidu 8-chlorresorufin-4-karboxylové kyseliny a 410 mg N-hydroxysukcinimidesteru 2-(1-difenylyhydantoinyl)-octové kyseliny získá žádaný produkt.

Výtěžek: 150 mg.

Hodnota R_f = 0,38 (silikagel, rozpouštědlový systém:

směs chloroformu, methanolu a ledové kyseliny octové v poměru 9:1:0,1).

UV/VIS (0,1M roztok kaliumfosfátového pufru pH 8,0):

$$\lambda_{\max} = 581 \text{ nm}$$

Fluorescenční emise: $\lambda_{\max} = 597 \text{ nm}$.

Příklad 12

Kopulace piperazidu 8-chlorresorufin-1-karboxylové kyseliny s (2-aminoethyl)amidem theofylin-7-propionové kyseliny

a) 8-chlorresorufin-1-karboxylová kyselina

8,7 g 4-chlor-6-nitrosoresorcinu a 7,71 g 3,5-dihydroxybenzoové kyseliny se rozpustí ve 200 ml methanolu, k získanému roztoku se při teplotě 0 °C přidá 4,8 g oxidu manganického a po částech 5,3 ml koncentrované kyseliny sírové. Reakční směs se míchá 2 hodiny při teplotě místnosti, potom se zfiltruje a až do barevného přechodu na modrou barvu se přidá amoniak a 200 ml vody. Získaný roztok se zfiltruje, k filtrátu se přidá 25 ml koncentrovaného amoniaku a 20 g práškového zinku při chlazení ledem a potom se směs bez dalšího chlazení míchá dalších asi 15 minut. Ke směsi se přidá 200 mg aktivního uhlí, směs se zfiltruje, filtrát se okyselí na pH 2 a vyloučený derivát resorufinu se odstředí.

Výtěžek: 3,9 g.

Hodnota R_f = 0,88 (silikagel, rozpouštědlový systém:

směs n-butanolu, ledové kyseliny octové a vody v poměru 4:1:1).

b) N,O,O-triacetyl-8-chlor-dihydroresorufin-1-karboxylová kyselina

Z 3,5 g 8-chlorresorufin-1-karboxylové kyseliny se analogickým postupem jako je popsán v příkladu 1b) získá 3,2 g produktu.

Hodnota R_f = 0,43 (silikagel, rozpouštědlový systém:

směs chloroformu, methanolu a ledové kyseliny octové v poměru 9:1:0,1).

c) Trifluoracetát piperazidu 8-chlorresorufin-1-karboxylové kyseliny

Z 3 g triacetyl-derivátu, který byl připraven jako v příkladu 10b) se získá analogickým postupem, jako se popisuje v příkladech 1c) až 1h) 1,4 g produktu.

Hodnota $R_f = 0,08$ (silikagel, rozpouštědlový systém:

směs chloroformu, methanolu, ledové kyseliny octové v poměru 9:1:0,1).

d) Kopulace piperazidu 8-chlorresorufin-1-karboxylové kyseliny s (2-aminoethyl)amidem theofylin-7-propionové kyseliny

Z 420 mg piperazidu N,O,O-triacetyl-8-chlor-dihydroresorufin-1-karboxylové kyseliny a 300 mg (2-aminoethyl)amidu theofylin-7-propionové kyseliny se získá 190 mg produktu.

Příklad 13

Značení imunoglobulinu G pomocí N'-hydroxysukcinimidesteru N-(4-resorufinylkarbonyl)sarkosinu

100 mg lidského imunoglobulinu G (IgG) se rozpustí v 10 ml 0,1M kalimfosfátového pufru o pH 8,0 a k získanému roztoku se přidá 5 mg N'-hydroxysukcinimidesteru N-(4-resorufinylkarbonyl)sarkosinu (srov. příklad 7e). Směs se ponechá v klidu 12 hodin při teplotě místnosti a potom se chromatografuje na sorbentu Ultrogel ACA 2002 (LKB). Značená bílkovina se přitom vymývá před volným nízkomolekulárním resorufinem. Stupeň značení se zjišťuje měřením extinkce. Činí hodnotu 3, tzn., že na molekulu imunoglobulinu G jsou vázány 3 molekuly derivátu resorufinu.

Příklad 14

Značení imunoglobulinu G pomocí N'-hydroxysukcinimidesteru N-(4-resorufinylkarbonyl)piperidin-4-karboxylové kyseliny

a) N-(4-resorufinylkarbonyl)piperidin-4-karboxylová kyselina

2,0 g chloridu N,O,O-triacetyldihydroresorufin-4-karboxylové kyseliny, který je popsán v příkladu 1c), se nechá reagovat analogickým postupem jako je popsán v příkladu 1e) a 0,9 g hydrochloridu methylesteru piperidin-4-karboxylové kyseliny, analogickým postupem jako je popsán v příkladu 1f) a 1g) se produkt deacetyluje a oxiduje a zmýdelní se působením hydroxidu sodného na N-(4-resorufinylkarbonyl)piperidin-4-karboxylovou kyselinu.

Výtěžek: 0,9 g.

Hodnota $R_f = 0,44$ (silikagel RP-18, rozpouštědlový systém:

směs nitromethanu a ethylalkoholu v poměru 4:1).

UV/VIS (0,1M roztok kaliumfosfátového pufru, pH 8,5):

$$\lambda_{\max} = 576,2 \text{ nm}$$

b) N'-hydroxysukcinimidester N-(4-resorufinylkarbonyl)piperidin-4-karboxylové kyseliny

Z 200 mg N-(4-resorufinylkarbonyl)piperidin-4-karboxylové kyseliny, 240 mg N-hydroxysukcinimidu a 468 mg dicyklohexylkarbodiimidu se získá analogickým postupem jako je popsán v příkladu 7e) 190 mg produktu.

Hodnota $R_f = 0,7$ (silikagel RP-18, rozpouštědlový systém:

směs nitromethanu a ethanolu v poměru 4:1).

IČ spektrum (technika KBr):

3415 (m, široký), 1814 (w), 1773 (m), 1734 (s), 1626 (m), 1214 (m) cm^{-1} .

c) Značení králíčího imunoglobulinu G pomocí N'-hydroxysukcinimidesteru N-(4-resorufinylkarbonyl)piperidin-4-karboxylové kyseliny

K 10 mg králičího imunoglobulinu G rozpuštěného v 1 ml 0,1M roztoku kaliumfosfátového pufru o pH 8,5 se přidá 100 μ l roztoku 1,9 mg N-hydroxysukcinimidesteru N-(4-resorufinylkarbonyl)piperidin-4-karboxylové kyseliny v 1 ml 1,4-dioxanu a směs se ponechá stát 2 hodiny při teplotě místnosti. To odpovídá poměru 6,4 mol derivátu resorufinu na 1 mol králičího imunoglobulinu G.

Po chromatografii na ACA 202 za použití 0,1M roztoku kaliumfosfátového pufru o pH 8,5 jako elučního činidla se získá frakce bílkoviny, která má absorpční poměr $A_{578}/A_{280} = 0,97$, což odpovídá stupni zatížení 3,4 mol resorufinu na 1 mol imunoglobulinu G.

Přidá-li se při analogickém pokusu k 10 mg králičího imunoglobulinu G 20 μ l roztoku aktivovaného resorufinu, pak se získá při 1,05 mol nabídnutého barviva na 1 mol imunoglobulinu G stupeň zařízení 0,8.

Absorpční maximum imunoglobulinu G značeného resorufinem činí 578 nm. Roztok fluoreskuje intenzívně světle červenou barvu.

Vystaví-li se roztok imunoglobulinu G značeného resorufinem po dobu jednoho měsíce dennímu světlu, klesne hodnota fluorescence na 59 % původní hodnoty, zatímco u analogicky vyrobeného imunoglobulinu G značeného fluoresceinisothiokyanátem na 16 % a u imunoglobulinu G značeného texasskou červení na 12 %.

Příklad 15

Stanovení difenylhydantoinu v lidském séru pomocí FPIA

K 1950 μ l 0,1M roztoku natriumfosfátového pufru (pH 7,8) se přidá 5 μ l vzorku ⁽¹⁾, 25 μ l roztoku protilátky ⁽²⁾ a 25 μ l roztoku difenylhydantoin-resorufinu ⁽³⁾. Po 5-minutové inkubaci při teplotě 37 °C se měří fluorescenční polarisace. (excitační vlnová délka: 575 nm, emisní vlnová délka 594 nm, měřicí přístroj: fluorescenční spektrometr 650-108, Hitachi).

- (1) Vzorek: lidské sérum od dárce se známým množstvím difenylhydantoinu. Ke zhotovení kalibrační křivky se použije sérum lidského dárce, které obsahuje difenylhydantoin v koncentraci

- a) 2,5 μ g/ml
- b) 5 μ g/ml
- c) 10 μ g/ml
- d) 20 μ g/ml
- e) 40 μ g/ml.

- (2) roztok protilátky:

450 μ g protilátky/ml 0,1M roztoku natriumfosfátového pufru (pH 7,8)

Protilátky se získají imunizací ovcí difenylhydantoinem, který je vázán na albumin hovězího séra, podle obvyklých metod.

Antisérum se čistí srážením síranem amonným a chromatografií na celuloze DEAE.

- (3) roztok difenylhydantoin-resorufinu (10^{-6} M):

konjugát difenylhydantoin-resorufin z příkladu 1i) v 0,1M roztoku natriumfosfátového pufru (pH 7,8).

Naměřené výsledky, které byly získány pomocí roztoků difenylhydantoinu 1a), 1b), 1c), 1d) a 1e), jsou znázorněny na připojeném výkresu. Na tomto výkresu jsou vyneseny koncentrace difenylhydantoinu vzorků (μ g/ml) vůči naměřeným hodnotám polarisace (mP).

Pomocí takové kalibrační křivky lze také stanovovat koncentraci difenylhydantoinu ve vzorcích s neznámým obsahem difenylhydantoinu.

Srovnatelná kalibrační křivka se rovněž získá v případě, že se místo shora použitého konjugátu difenylhydantoinu z příkladu li) použije vždy konjugátu difenylhydantoinu z příkladů 2, 7 nebo 9f).

Příklad 16

Stanovení aktivity endoglykosidázy pomocí resorufin-(vyšší)glykopeptidu na bázi mannosy

Poznámka: v další části textu bude používáno výrazu "(vyšší) mannosaglykopeptid" z důvodu jednoduššího vyjádření vlastního významu tohoto slova, kterým je vyšší glykopeptid, ve kterém je částí cukru mannosy.

a) Značení (vyšší)mannosaglykopeptidu N'-hydroxysukcinimidesterem N-(4-resorufinylkarbonyl)-sarkosinu

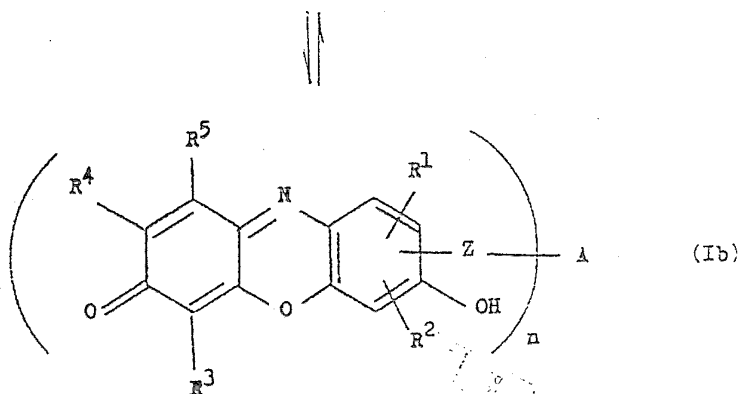
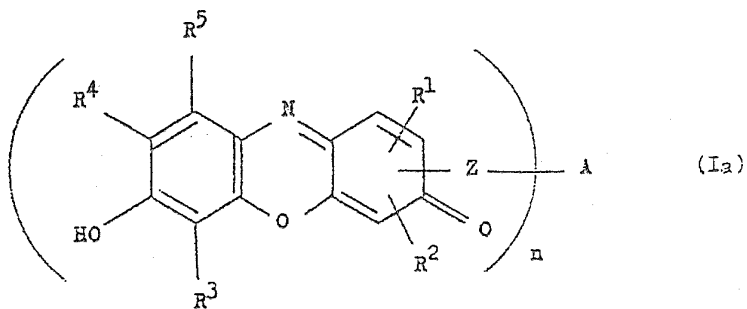
50 mg (vyšší)mannosaglykopeptidu (vyrobeného podle Huanga a dalších, Carbohydrate Res. 13, 127-137 (1970) se smísí s přidavkem 10 ml 0,1M roztoku kaliumfosfátového pufru o pH 8,0. Roztok se dodatečně upraví na pH 8,0. Potom se přidá 25 mg N'-hydroxysukcinimidesteru N(4-resorufinylkarbonyl)sarkosinu rozpouštěného ve 3 ml dioxanu, po jedné hodině se znovu přidá stejné množství N-hydroxysukcinimidesteru barviva ve 3 ml dioxanu. Směs se míchá 14 hodin při teplotě místnosti, potom se odpaří ve vakuu dioxan a zbytek se zředí vodou na obsah 70 ml a potom puforem A (= 0,02M roztok TRIS-HCl, 2 mM chloridu hořečnatého, 2 mM chloridu manganatého, 2 mM chloridu vápenatého, pH 7,2) na objem 140 ml. Hodnota pH se dodatečně upraví vodným amoniakem na 7,2. Přitom vzniklá sraženina se odstředí. Supernatant se přenesse na sloupec Con A-Sepharose (1 x 15 cm). Puforem A se vymývá volné barvivo. Jakmile protékající kapalina již není červená, vymývá se 1. frakce resorufin-(vyšší)mannosaglykopeptidu pomocí 2% methylmannosidu v pufru A jakožto elučním činidlem (asi 100 ml). Potom se vymývá 2. frakce 2% vodným methylmannosidem. Obě frakce se dialyzují proti vodě a lyofilizují se. Obě frakce jsou vhodné ke stanovování aktivity endoglykosidázy, které je popsáno v odstavci b) dále.

b) Stanovení aktivity endoglykosidázy

Resorufin-(vyšší)mannosaglykopeptid se inkubuje ve vhodném pufru s endoglykosidázou, například endoglykosidáza H a citrátový pufr pH 5,5 (= vzorek 1). Paralelně k tomuto pokusu se současně provádí pokus se vzorkem, který neobsahuje endoglykosidázu, ale jinak je shodný (= vzorek 2). Po inkubaci se k oběma vzorkům přidá Con A-Sepharose a směs se protřepává, aby se vázal resorufin-(vyšší)mannosaglykopeptid. Peptid značený resorufinem, u něhož byla část cukru v důsledku aktivity enzymu odštěpena, se neváže. Po 15 minutách se Con A-Sepharose odstředí, supernatant se upraví na pH 7,5 a změří se fluorescence (excitace například 550 nm, emise $\lambda_{\max} = 595$ nm). Rozdíl mezi vzorkem 1 a nulovou hodnotou (= vzorek 2) udává množství štěpeného resorufin-(vyšší)mannosaglykopeptidu a je tudíž mírou aktivity enzymu.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob výroby derivátů resorufinu obecných vzorců Ia a Ib



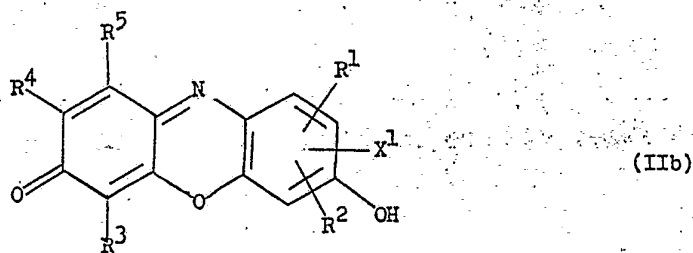
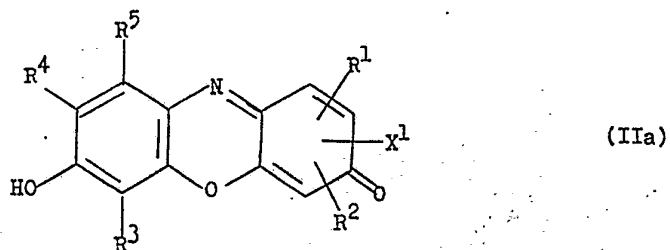
ve kterých

R^1 , R^2 , R^3 , R^4 a R^5 , které mohou být vždy stejné nebo navzájem rozdílné, znamenají atom vodíku, atom halogenu, karboxyskupinu, karboxamidoskupinu, alkoxykarbonylovou skupinu s 1 až 5 atomy uhlíku v alkoxylové části, kyanoskupinu, nitroskupinu, alkylovou skupinu s 1 až 5 atomy uhlíku nebo alkoxyskupinu s 1 až 5 atomy uhlíku, které jsou popřípadě substituovány karboxyskupinou, karboxamidoskupinou, alkoxykarbonylovou skupinou s 1 až 5 atomy uhlíku v alkoxylové části, kyanoskupinou nebo nitroskupinou, přičemž R^4 a R^5 mohou společně představovat anelovaný aromatický uhlovodík se 6 až 10 atomy uhlíku, který je popřípadě substituován jednou nebo několika substituenty zvolenými ze skupiny, která je tvořena sulfoskupinou, karboxyskupinou a alkoxyskupinou s 1 až 5 atomy uhlíku,

Z

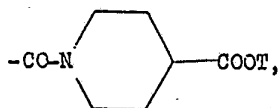
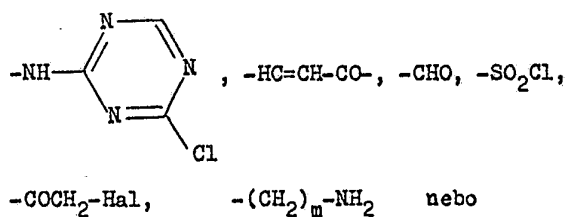
znamená můstkový člen vytvořený ze zbytků X^1 , X^2 , X^3 , X^4 a M, přičemž X^1 , X^2 , X^3 , X^4 a M mají dále uvedené významy,

A znamená zbytek haptenu, antigenu, protilátky, substrátu či nosiče a
 n znamená celé číslo od 1 do 200,
 vyznačující se tím, že se na sloučeniny obecných vzorců IIa a IIb



ve kterých

R^1 , R^2 , R^3 , R^4 a R^5 mají významy uvedené pod obecným vzorcem Ia a Ib, a
 X^1 znamená reaktivní skupinu, jako skupinu $-COOH$, $-COOT$, $-COOCO_2T^1$,
 $-NCO$, $-NCS$,



příčemž

T znamená alkylovou skupinu s 1 až 5 atomy uhlíku nebo elektronegativovaný zbytek esteru, jako například zbytek N-hydroxysukcinimid-esteru,

T¹ znamená alkylovou skupinu s 1 až 5 atomy uhlíku a

m znamená celé číslo od 0 do 3, a

Hal znamená atom halogenu,

a v případě skupin obsahujících primární aminoskupinu znamená rovněž skupinu s odpovídající sekundární aminoskupinou, nebo má význam dále uvedeného substituentu X² s tím, že význam substituentů X¹ a X² je stejný nebo navzájem různý,

působí diaminem, dikarboxylovou kyselinou nebo jejím derivátem, dialdehydem nebo aminos-karboxylovou kyselinou obecného vzorce IV



ve kterém

X³ a X⁴ znamenají reaktivní skupiny a

M znamená zbytek bifunkční sloučeniny s 1 až 5 atomy uhlíku,

a ligandem obecného vzorce III



ve kterém

X² znamená reaktivní skupinu, jako skupinu -NH₂, -SH, -OH, -COOH nebo sekundární aminoskupinu odpovídající skupině -NH₂, nebo má význam shora uvedeného substituentu X¹ s tím, že při téže reakci je význam substituentů X¹ a X² stejný nebo navzájem různý, a

A má shora uvedený význam,

příčemž se popřípadě při jednotlivých reakčních stupních zavedou chránicí skupiny a potom se opět odštěpí a jednotlivé reaktivní skupiny X¹, X², X³ a X⁴ se popřípadě převedou na jiné reaktivní skupiny.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se jako bifunkční sloučeniny s 1 až 5 atomy uhlíku používá piperazinu, 1,2-ethylendiaminu, glycinu, sarkosinu, β-alaninu nebo piperidin-4-karboxylové kyseliny.

