(12) **PATENT**

(19) NO (11) **322012** (13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl.
C07D 279/36 (2006.01)
A61K 31/5415 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20014720	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2000.01.31 PCT/US00/02602
(22)	Inng.dag	2001.09.28	(85)	Videreføringsdag	2001.09.28
(24)	Løpedag	2000.01.31	(30)	Prioritet	2000.01.31, WO, PCT/US00/02602
(41)	Alm.tilgj	2001.11.27			
(45)	Meddelt	2006.08.07			

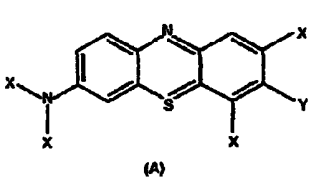
(73)	Innehaver	Zila Biotechnology Inc , 5227 North 7th Street, AZ85014-2800 PHOENIX, US
(72)	Oppfinner	Douglas D Burkett, 942 South Coral Key Court, AZ95233 GILBERT, US
(74)	Fullmektig	Bryn Aarflot AS , Postboks 449 Sentrum, 0104 OSLO, NO

(54) Benevnelse **Forbindelser for identifisering av dysplastisk vev og anvendelse derav**

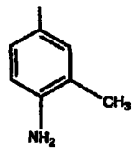
(56) Anførte publikasjoner Ingen

(57) Sammendrag

Forbindelser med strukturformelen (A) hvor X er hydrogen, metyl eller Y; Y er -NH-R eller hydrogen; og R er metyl, eller formel (B) er nyttige som in vivofarger for påvisning av dysplastisk vev.



(A)



(B)

Denne oppfinnelse angår forbindelser for identifisering av dysplastisk vev og anvendelse derav.

Forbindelsene kan følgelig identifisere mistenkt dysplastisk, dvs. unormalt, vev slik som kreftvev og precancerøst vev.

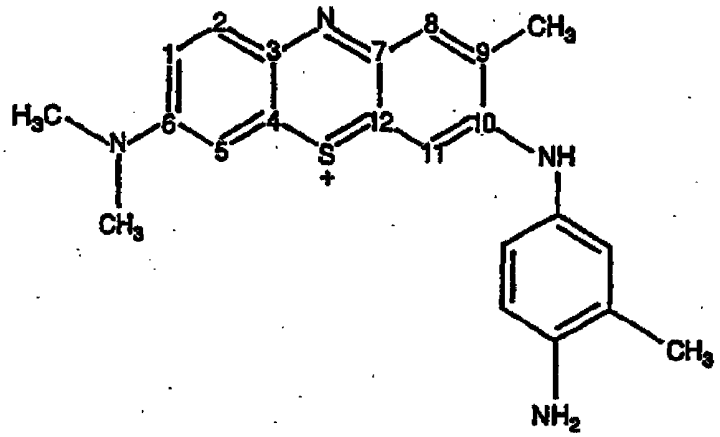
De forskjellige utførelsesformer av oppfinnelsen og utøvelsen av denne vil være åpenbare for fagfolk på området ut fra følgende detaljerte beskrivelse derav og tegningen, hvor:

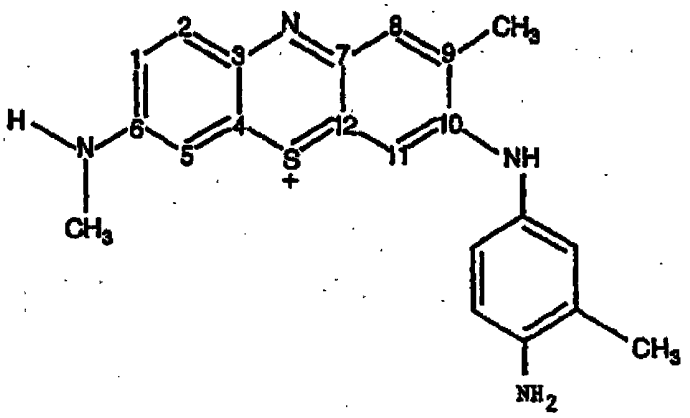
Fig. 1 er et prosess-skjema som viser en prosess for syntetisering av de nye forbindelser ifølge foreliggende oppfinnelse.

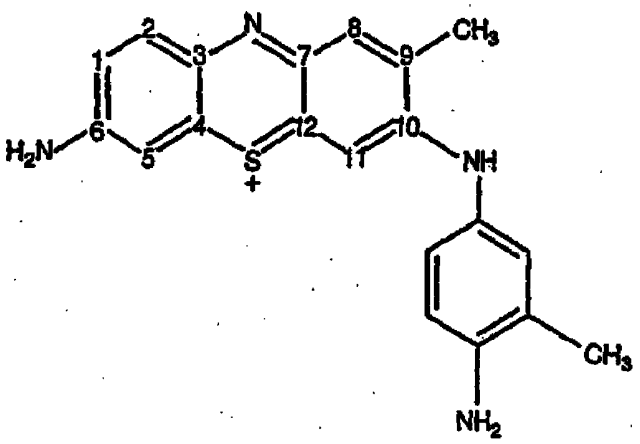
De fleste epitel-lesjoner kommer av traumer. Imidlertid er andre lesjoner dysplastiske tumorer, hvorav noen kan være benigne, men noen kan enten være kreft-tumorer eller prekankrøse tumorer. Dessuten er mange dysplastiske lesjoner små og blir lett oversett ved visuell rutineundersøkelse av klinikere, spesielt de som finnes i kroppshulrom så som munnhulen.

Det er kjent en diagnostisk in vivo-test som identifiserer og påviser mistenkt dysplastisk vev. Denne screeningtest, hvor det anvendes toluidinblått O (toloniumklorid) som in vivo-farge, som selektivt farger kreftvev og precancerøst vev, er generelt beskrevet i US-patent nr. 4 321 251 og US-patent nr. 5 372 801. Når en mistenkt dysplastisk lesjon er identifisert ved Mashberg-protokollen, kan det tas en vanlig biopsiprøve som underkastes histologisk undersøkelse, for å bekrefte om hvorvidt lesjonen er malign eller precancerøst. Zila, Inc. har lisens på utstyrssett for utførelse av denne test, inneholdende for-blandede farge- og skylleoppløsninger i de riktige mengder og konsentrasjoner, og disse er kommersielt tilgjengelige i flere land under varemerkene ORASCREEN® og ORATEST®.

Det er nå oppdaget nye forbindelser som er nyttige som biologiske in vivo-farger for selektiv farging og påvisning av dysplastisk vev. Foreliggende oppfinnelse vedrører følgelig forbindelser med strukturformelene







Foreliggende oppfinnelse vedrører videre anvendelse av en forbindelse ifølge et hvilket som helst foregående krav for fremstilling av en sammensetning for identifisering av dysplastiske vev ved selektiv farging av dysplastisk vev.

Forbindelsene ifølge oppfinnelsen syntetiseres ved hjelp av en prosess i likhet (med unntak angitt nedenfor) med prosessen beskrevet i US-patent nr. 418 055, utstedt 30. november 1889 (Dandliker), for fremstilling av toluidinblått O («TBO»). Dandliker-syntesen er en serie av tre oksidasjonstrinn: (1) oksidasjon av N,N-dimetyl-p-fenylendiamin, f.eks. med kaliumdikromat, under dannelse av 2-amino-5-dimetylaminofenyl-tiosulfonsyre; (2) kondensasjon av tiosulfonsyren med o-toluidin under dannelse av den tilsvarende indamin-tiosulfonsyre; og (3) ringslutning av indamin-tiosulfonsyren, f.eks. i nærvær av et kompleksdannelsesmiddel ved koketemperatur i ca. 30 minutter, under dannelse av toluidinblått O. Reaksjonsblandingen blir så avkjølt, og reaksjonsproduktet fra ringslutningsreaksjons-komplekset saltes ut. Rensing av komplekset kan utføres ved gjentatt gjenoppløsing og gjenutfelling.

Fremgangsmåtene for fremstilling av forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse er forskjellige fra Dandliker-syntesen ved at det kompleksdannende middel tilsettes før det tredje oksidasjontrinn, fortrinnsvis under det første oksidasjonstrinn, og de nye produkter ifølge foreliggende oppfinnelse isoleres og separeres fra det utfelte kompleks ved hjelp av høyytelses-væskekromatografi (HPLC).

De nye forbindelser ifølge oppfinnelsen anvendes i henhold til Mashberg-protokollen til selektiv farging av dysplastisk epitelvev, bortsett fra at hver av disse forbindelser anvendes i stedet for toluidinblått O. Foreliggende oppfinnelse påtenker også en fremgangsmåte for påvisning av dysplastisk vev in vivo hos mennesker, som innbefatter det trinn at det på humant epitelvev påføres et preparat som innbefatter ett av de ovenfor beskrevne nye produkter eller blandinger derav.

Det vises nå til tegningen.

Fig. 1 er et prosessdiagram som viser en fremgangsmåte for fremstilling av de nye forbindelser ifølge foreliggende oppfinnelse.

Utgangsmaterialet 10 for syntesen er kommeersielt tilgjengelig N,N-dimetyl-a-fenylendiamin med høy renhet.

Dannelse av første reaksjonsblanding

En vandig oppløsning av utgangsmaterialet 10 oksideres 11, fortrinnsvis ved under 10°C, spesielt ved under ca. 5°C, ved omsetting med et egnet oksidasjonsmiddel 12, f.eks. kaliumdikromat 12, i nærvær av syre, aluminiumsulfat og et reagens 13 (som antas å kompleksbinde mellomproduktet (-produktene) og anvendes i et senere trinn av prosessen til å kompleksbinde reaksjonsprodukt-komponentene, f.eks. sinkklorid. Deretter tilsettes en kilde til tiosulfat-ioner 14, f.eks. natriumtiosulfat, under dannelse av en første reaksjonsblanding 15 inneholdende det første mellomprodukt, 2-amino-5-dimetylaminofenyl-tiosulfonsyre.

Dannelse av andre reaksjonsblanding

Den første reaksjonsblanding 15 blir så omsatt videre, fortrinnsvis ved en temperatur på ikke mer enn ca. 10°C, med ytterligere oksidasjonsmiddel 16, f.eks. kaliumdikromat, og o-toluidinhydroklorid 17, i et kondensasjonstrinn 18, under dannelse av det annet mellomprodukt, et kondensasjonsprodukt, indamintiosulfonsyre, i den andre reaksjonsblanding 19.

Dannelse av tredje reaksjonsblanding

Den andre reaksjonsblanding 19 blir så oksidert videre 21, fortrinnsvis ved tilsetting av et egnet oksidasjonsmiddel 22, f.eks. kaliumdikromat, ved en temperatur på ikke mer enn ca. 10°C. Dette følges av tilsetting av koppersulfat, sinkklorid-kompleksdannelsesmiddel, syre og oppvarming til 100°C for bevirkning av lukking av indaminringen, under dannelse av et slutt-reaksjonsprodukt i en tredje reaksjonsblanding 24. På dette punkt blir reaksjonsproduktet separert fra den tredje reaksjonsblanding og renset.

Separasjon/rensing av tredje reaksjonsprodukt

Ved den for tiden foretrukne utførelsesform av fremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse blir reaksjonsproduktet for eksempel utfelt fra den tredje reaksjonsblanding ved kompleksbinding av 24 med et egnet kompleksdannelses-middel 25, f.eks. sinkklorid, under dannelse av det komplekse sinkklorid-dobbeltsalt. Det utfelte materiale filtreres 26 fra væskefasen og vaskes med natriumkloridoppløsning 27. Den vaskede filterkake blir så igjen oppløst 28 i et

kritisk[1] volum av vann 29 under dannelse av en reaksjonsproduktoppløsning 30, som så blir filtrert 31 under fjerning av uoppløste faststoffer 32a, som kastes. Sinkklorid, fulgt av et kritisk[2] volum/konsentrasjon av natriumklorid 33, blir så tilsatt til filtratet 32, hvorved sinkklorid-dobbeltsaltet igjen utfelles.

Dobbeltsaltproduktet separeres fra blandingen ved filtrering, hvorved det fås en filterkake 34. Som angitt ved den stiplede linje 35, kan filterkaken 34 oppløses på nytt, filtreres, utfelles på nytt og isoleres på nytt multiple ganger for oppnåelse av den ønskede grad av renhet og utbytte av dobbeltsaltkompleks-reaksjonsproduktet. Det endelige rensede filterkake-kompleksprodukt 34 blir så oppløst i vann, og de nye forbindelser ifølge foreliggende oppfinnelse isoleres og separeres ved hjelp av HPLC-prosesser, beskrevet nedenfor.

UTFØRELSESEKSEMPLER

Følgende eksempler er vist for å illustrere utførelsen av oppfinnelsen på en slik måte at fagfolk på området kan settes i stand til å lage de nye forbindelser ifølge oppfinnelsen og å utføre de nye diagnostiske metoder ved anvendelse av slike nye forbindelser, som sammen utgjør de forskjellige utførelsesformer av oppfinnelsen, og å vise for fagfolk på området de for tiden kjente beste måter for utførelse av de forskjellige utførelsesformer av oppfinnelsen.

EKSEMPEL 1

Fremstillingsprosess

Dette eksempel illustrerer de nøyaktige fremgangsmåter for fremstilling av en sats av fargeproduktkompleks og separasjon av de nye forbindelser ifølge oppfinnelsen fra det komplekse produkt ved HPLC.

Fremstilling av råmaterialoppløsninger

[1] Hvis det anvendes for mye vann, hindrer det isolasjon av reaksjonsproduktet. Hvis det anvendes for lite vann, (1) blir ikke alt reaksjonsprodukt oppløst, noe som reduserer utbyttet, og (2) det reduserer produktets renhet.

[2] Hvis det anvendes for lite natriumklorid, vil ikke hele produktet bli saltet ut, noe som reduserer utbyttet. Hvis det anvendes for mye natriumklorid, vil det gjøre at forurensninger utfelles sammen med reaksjonsproduktet, noe som reduserer produktets renhet.

Utstyr/materiell:

A. Vekt av typen Ohaus IP15KS
B. Vekt av typen AnD HV150KAI
C. Vekt av typen Fairbanks H90-5150
D. Vekt av typen OHAUS WB25/1-20W
E. Rørere av typen Cole Parmer (51201-30) og Thermolyne (S25535)
F. Prøvetakingsinnretninger, så som ståløser, trommelprøvetakings-innretninger osv.
G. Erlenmeyer-kolber, begerglass, glassballonger og annet hensiktsmessig glassutstyr
H. Produksjonsoppløsnings-merkelapper.

Sikkerhetsutstyr:

Beskyttelsesutstyr, så som hansker, sikkerhetsbriller, laboratoriefrakker og masker, bør bæres ved håndtering av kjemikalier, i henhold til MSDS-retningslinjer.

Fremstillingsmetode for råmaterialoppløsninger:

Til saltsyre, 1364,2 g (± 5,5 g), tilsettes 1364,2 g (± 5,5 g) USP-renset vann. Rør om til oppløsningen er klar.

Til aluminiumsulfat-heksadekahydrat, 1779,1 g (± 7,0 g), tilsettes 2548,9 g (± 10,0 g) USP-renset vann. Rør om til oppløsningen er klar.

Til sinkklorid, 7384,6 g (± 30,0 g), tilsettes 2786,7 g (± 11,0 g) USP-renset vann. Rør om til oppløsningen er klar.

Til kaliumdikromat, 2101,9 g (± 8,0 g), tilsettes 25203,8 g (± 100 g) USP-renset vann. Rør om til oppløsningen er klar.

Til natriumtiosulfat-pentahydrat, 1526,6 g (± 6,0 g), tilsettes 2043,6 g (± 8,0 g) USP-renset vann. Rør om til oppløsningen er klar.

Til koppersulfat-pentahydrat, 509,7 g (± 2,0 g), tilsettes 1613,1 g (± 6,0 g) USP-renset vann. Rør om til oppløsningen er klar.

Til svovelsyre, 600,0 g (± 2,0 g), tilsettes 600,0 g (± 2,0 g) USP-renset vann. Rør om til oppløsningen er klar.

Til natriumklorid, 70,4 kg (± 250 g), tilsettes 234,4 kg (± 850 g) USP-renset vann. Rør om til oppløsningen er klar.

SYNTESE

Synteseutstyr og -materiell:

LFE-kontrollpanel (3000)

Glasskledte 76 liters rensetanker med kappe og lokk (E71224)

To 380 liters rensetanker med kappe og lokk (P1, PT-001) (P2, L-13621)

Resirkulasjonskjøler av typen FTS (RC96C032) og 1895 liters kjølelagringstank (500 CST)

Tre Caframo-blandere (BDC-1850) (R1, 18500961) (P1, 18501148) (P2, 18501173) med aksel («shaft») og skovlhjul

Lightning-blander (L1U08) (201550)

Tre varmevekslere (Gardner Machinery) (R1, 01960763) (P1, 01960764) (P2, 08950727)

Tre 12 KW kappefluid-resirkulatorer (Watlow, BLC726C3S 20)

Tre resirkulasjonspumper (Sta-Rite, JBHD-62S, C48J2EC15)

Masterflex digital peristaltisk pumpe (A94002806)

Masterflex peristaltisk pumpe (L95003320)

Peristaltisk pumpe av typen Cole Parmer (B96002074)

Filtreringsenhet av typen Neutsche (70-2038, 42421-1)

To filtreringsenheter av typen Büchner (Z11, 624-6, Z10 441-8)

Vakuumpumpe av typen Siemens (F2BV2)

227 liters glasskledt oppsamlingstank med lokk (86854, E164-1186)

Luftkompressor (DF412-2) (9502312538)

Strømningsregulator (3-5500) (69705069190)

Seks satsreguleringsinnretninger (3-5600) (nr. 1: 69705069191, nr. 2: 69705069199, nr. 3: 69705069194, nr. 4: 69705058829, nr. 5: 69705058805, nr. 6: 69705069195)

Seks strømningssensorer (nr. 1: 69704295165, nr. 2: 69704024995, nr. 3: 69704024994, nr. 4: 69704025027, nr. 5: 69612178606, nr. 6: 69703120990)

Fire diafragmapumper (M1)

Fire bølgedempere («surge suppressors») (A301H) (nr. 2: 15557, nr. 3: 15561, nr. 4: 15558, nr. 5: 15559)

Fire luftregulatorer (CFR10)

Fire solenoidventiler (anvendt med luftregulatorer)

Fire lavtstrømningssensorer (FS-500)

Tre solenoidventiler (EASM5V16W20)

Luftfilter / Regulator (T1R)PTFE / F06R113AC

Filtermedier, polypropylen (7211-1)

Filtermedier, Whatman kvalitet 52

Rørmaterialer av typen PharMed (-18, -82, -90)

pH-Meter; Hanna 9321 (1303675) og Orion 620 (001911)

Spektrofotometer 20 (3MU7202070)

Fisher Scientific vakuumovn (9502-033)

VWR 1370 FM trykkluftovn (1370FM)

Støv/tåke-maske

Laboratoriemølle av typen Thomas Wiley (3375-E10)

Blander av typen Patterson-Kelley (Blendmaster, C416578)

Vekt av typen OHAUS TS4KD

Vekt av typen OHAUS IP15KS

Vekt av typen Mettler AG 104
Vekt av typen AnD HV150KA1
Vekt av typen Fairbanks H90-5150
Skriver av typen OHAUS AS123
Skriver av typen OHAUS AS142

Multifunksjonsskriver av typen AD-8121
Matriksskriver av typen Citizen iDP 3540 punkter
Hewlett Packard HPLC (1050)
Ultralyd-renseapparat (8892-DTH, QCC9601 005C)
Termoelement-termperaturregistrator type K (KTx, 6292753, 6355146)
Erlenmeyer-kolber (8 liter, 6 liter, 4 liter,1 liter)
Begerglass (8 liter, 6 liter, 500 ml, 250 ml)
Glassballonger (4 liter, 10 liter, 50 liter)
HDPE-tromler (208 liter, 380 liter)
Volumetriske kolber (100 ml)
Plasttrakt
Pasteurpipetter og kule- og volumetriske pipetter (10 ml, 5 ml) og ball («bulb»)
Belger (25 ml, 50 ml)
Veiepapir
Spatler
Emballasjemateriell (beholdere, lokk, merkelapper)
Råmaterialoppløsninger

SYNTESE: Trinn 1

Syntese av 2-amino-5-dimetylaminofenyltiosulfonsyre

- Kontroller helheten av USP-vannsystemet. Det utveide rensede vann av USP-kvalitet (28 000 g ± 100,0 g) tilsettes i reaktoren, og det omrøres ved 190 ± 10 omdr. pr. min.

- Tilsett N,N-dimetyl-1,4-fenylendiamin (5,128 mol, 720,0 g ± 3,0 g). Materialet skal tilsettes som pulver (ingen klumper). Rør om i 10 minutter (± 5 minutter).

- Tilsett saltsyre (6 N, 1136,9 g ± 5,0 g). Rør om i 15 minutter (± 5 minutter).

- Ta ut en reaksjonsblandingsprøve på ca. 10 ml ved anvendelse av en prøvetakingsinnretning av plast. Kontroller pH. pH må være 2,8-3,8 ved 25°C ± 5°C.

- Tilsett aluminiumsulfat-heksadekahydratoppløsning (4328,0 g ± 21,0 g). Rør om i 10 minutter (± 5 minutter) ved 275 ± 10 omdr. pr. min.).

- Tilsett sinkkloridoppløsning (3641,5 g ± 18,0 g). Avkjøl til 4°C ± 1°C.

- Når temperatureren (PV1) er 4°C ± 1°C, tilsettes kaliumdikromatoppløsning (6532,4 g ± 32,0 g) i et tidsrom på 20 minutter (± 5 minutter). Når tilsettingen er fullført, rør om i 20 minutter (± 5 minutter).

- Mens temperaturen holdes på under ca. 10°C, tilsettes natriumtiosulfat-pentahydrat-oppløsning (3570,2 g ± 18,0 g). Rør om oppløsningen ved 10°C i 30 minutter (± 5 minutter).

- Forandre innstillingspunktet til 60°C. Når temperaturen (PV1) når 60,0°C ± 3,0°C, får reaksjonsblandingen omrøres i 5 minutter (± 3 minutter) og innstillingspunktet på LFE-regulatoren forandres til 10,0.

- Når temperaturen har nådd 13,0°C ± 2,0°C, kontrolleres pH. pH må være 3,1-4,1 ved 24°C ± 5°C.

SYNTESE: Trinn 2

Syntese av indamintiosulfonsyre

- Vei ut o-toluidin (604,4 g ± 2,5 g) og avkjøl til 18°C ± 3°C i isbad. Tilsett saltsyre (6 N, 1230,7 g ± 5,0 g) langsomt til o-toluidinet. Fjern o-toluidinhydrokloridet fra isbadet og la oppløsningen få avkjøles til 38°C ± 3°C. Tilsett oppløsningen til reaksjonsblandingen og rør om i 5 minutter (± 3 minutter).

- Tilsett kaliumdikromatoppløsning (6532,4 g ± 32,0 g) i løpet av et tidsrom på 20 minutter (± 5 minutter). Når tilsettingen er fullført, rør om i 10 minutter (± 5 minutter).

- Forandre regulator-innstillingspunktet (SP1) til 60,0. Når temperaturen i reaksjonsblandingen når 60,0°C ± 3°C, får blandingen omrøres i 25 minutter (± 5 minutter). Det vil bli dannet et utfelt materiale bestående av et grønt indamin.

SYNTESE: Trinn 3

Syntese av sinkklorid-dobbeltsalt

- Innstill innstillingspunktet på LFE-regulatoren til 7,0. Når temperaturen i reaksjonsblandingen når 10,0°C ± 3°C, tilsettes kaliumdikromatoppløsning (6532,4 g ± 32,0 g) i løpet av et tidsrom på 20 minutter (± 5 minutter). Når tilsettingen er fullført, rør om i 20 minutter.

- Tilsett kaliumdikromatoppløsning (5225,9 g ± 26,0 g) i løpet av et tidsrom på 20 minutter (± 5 minutter). Når tilsettingen er fullført, rør om i 20 minutter (± 5 minutter).

- Tilsett sinkkloridoppløsning (3641,5 g ± 18,0 g). Rør om i 20 minutter (± 5 minutter) ved 360 ± 10 omdr. pr. min.

- Tilsett koppersulfat-pentahydrat (2122,8 g ± 10,0 g). Rør om i 15 minutter (± 5 minutter).

- Forandre regulator-innstillingspunktet (SP1) til 100,0. Når temperaturen i reaksjonsblandingen når 67,0°C ± 3°C, begynner man å tilsette svovelsyre-oppløsning til pH 2,9 ± 0,3 ved tilsetting av porsjoner (500 ml, 250 ml, 125 ml osv.) Rør om i 5-10 minutter etter hver tilsetting og kontroller pH.

- Når temperaturen i reaksjonsblandingen når 100,0°C ± 3°C, lar man blandingen få omrøres i 35 ± 5 minutter.

- Forandre regulator-innstillingspunktet (SP1) til 35,0. Når temperaturen i reaksjonsblandingen når 70,0°C ± 3°C, forandres regulator-innstillingspunktet (SP1) til 2,5. Avkjøl til 2,5°C i løpet av 4 timer og hold ved 2,5°C ± 2°C i 4-18 timer.

Rensetrinn: Trinn 1

- Filtrer reaksjonsblandingen gjennom egnet filtermedium (Whatman kvalitet 52).

- Når reaktoren er tom, vei ut 24,0 kg ± 150,0 g 30% NaCl-oppløsning og tilsett 24,0 kg ± 150,0 g USP-vann. Lokk reaktorens bunnventil og tilsett NaCl-oppløsningen på 15% i reaktoren. Rør om oppløsningen i kort tid. Når filtreringen er fullført, tilsettes NaCl-oppløsningen til filtreringsenheten for å skylle filterkaken.

- Kontroller tilstanden i den glasskledte rensetank nr. 1 på 380 liter, med kappe, og forsikre deg om at tanken er ren, og forsyn tanken med et HDPE-lokk, Caframo-rører, røreaksel, propellrøreverk og varmeelement-probe innsatt i en plast-varmeelementbrønn. Kontroller at bunnventilen er av og at uttaket er tillukket.

- Vei ut 190,0 kg ± 1,0 kg USP-vann i en HDPE-beholder og overfør vannet til rensetank 1. Rør om blandingen ved 350 omdr. pr. min. Når NaCl-vaskingen av filterkaken er fullført, tilsett filterkaken til rensetank 1 under omrøring.

- Rør om blandingen i 2-4 timer.

- Innstill LFE-regulatoren for rensetank 1 til 75,0 (SP1).

- Når temperaturen i blandingen (PV1) når 75,0°C ± 3°C, forandres innstillingspunktet på regulatoren til 40,0.

- La blandingen få omrøres ved 40°C og 350 omdr. pr. min. i 12-36 timer.

- Ta ut en prøve (gjennom bunnventilen) på ca. 50 ml. Mål ut 1,0 ml av prøven med en 1,0 ml pipette og fortynn til 100 ml i en volumetrisk kolbe på 100 ml. Ta så ut 10,0 ml av denne oppløsning med en 10,0 ml pipette og fortynn til 100 ml i en volumetrisk kolbe på 100 ml. Mål absorbansen for denne prøve med anvendelse av Spectronic 20+. Prøvens absorbans skal være ≥ 0,220.

Rensing: Trinn 2

- Filtrer blandingen gjennom filtermedium i filtreringsenheten. Samle opp filtratet i en tarert HDPE-beholder med lokk.

- Utstyr den glasskledte rensetank 2 med kappe, på 380 liter, med lokk, Caframo-rører, røreaksel, propellrøreverk og varmeelement-probe innsatt i en plast-varmeelementbrønn.

- I en ren HDPE-beholder veies ut en mengde av 30% NaCl-oppløsning lik oppløsningsvolumet angitt ovenfor, ved anvendelse av følgende formel:
  (ml oppløsning) (116,91 g NaCl-oppløsning / 100,0 ml NaCl-oppløsning) = g NaCl-oppløsning

- Ta ut ≈ 10 ml av filtratet og kontroller pH. pH må være 3,0-4,0. Overfør filtratet til rensetank 2. Rør om oppløsningen ved 350 omdr. pr. min.

- Tilsett sinkkloridoppløsning (1636,3 g ± 6,5 g)

- Overfør NaCl-oppløsningen (på vektbasis) til rensetank 2.

- Innstill LFE-regulatoren for rensetank 2 til 75,0 (SP1).

- Når temperaturen i blandingen (PV1) når 75,0°C ± 3°C, forandres innstillingspunktet på regulatoren til 5,0.

- Avkjøl til 5°C etter 6 timer og hold ved 5°C ± 4,0°C i 4-24 timer.

BEARBEIDELSE:

i. Filtrering

- Filtrer blandingen gjennom tarert filtreringsmedium (Whatman kvalitet 52) i filtreringsenheten.

- Vei ut 12 kg ± 50 g 30% natriumkloridoppløsning og fortynn med 12 kg ± 50 g USP-vann. Vask filterkaken med natriumkloridoppløsningen på 15% ved tilsetting av oppløsningen direkte i Büchner-trakten. Når filtreringen er fullført, fjern forsiktig filtrerpapiret inneholdende produktet.

ii. Tørking

- Anbring det rensede kompleks-reaksjonsprodukt i ovnen og tørk ved 50°C ± 3°C i 5 ± 1 time.

- Fjern kompleks-produktet fra trykkluftovnen og anbring i vakuumovnen. Tørk ved 45,0°C ± 3,0°C ved 95 kPa ± 6,8 kPa i 10 ± 2 timer.

iii. Maling

- Innsett sikten på 0,5 mm i laboratoriemøllen av typen Thomas Wiley. Tilknytt en ren beholder til utløpsrennen. Kammerdøren må være lukket og igjensmekket.

- Lukk glideklaffen i bunnen av trakten, fjern traktlokket og tilsett det tørkede kompleksprodukt. Sett traktlokket på plass igjen. Sett møllen PÅ og åpne glideklaffen litt. Tilfør produkt i møllekammeret langsomt nok til at møllen ikke arbeider saktere eller blir tilstoppet.

- Når malingen er fullført, fjern forsiktig beholderen fra avgivelsesrennen.

v. Blanding

- Overfør produktet til laboratorieblanderbeholderen av typen Patterson-Kelly, og lukk lokket. Innstill stoppeklokken til 15 minutter ± 5 minutter.

HPLC-Fremgangsmåte for isolering og separering

Dette eksempel beskriver en egnet HPLC-fremgangsmåte for isolering og separering av de nye forbindelser ifølge foreliggende oppfinnelse fra det tørkede, malte og blandede kompleksprodukt fremstilt som beskrevet ovenfor.

A. Instrumenter og utstyr

1. HPLC-kromatografimetoder
   a. HP1100 HPLC-kromatografisystem
   b. HP1100 dioderekke-detektor
   c. HP1100 kvaternær HPLC-pumpe

2. Fraksjonsoppsamling og -rensing
   a. ISCO Foxy Jr., 10-kanals fraksjonskollektor
   b. Rotasjonsfordamper av typen Büchi, modell R-124
   c. Sep-pak-patron, C_{18}, Varian

3. Massespektrumanalyser

a. Elektronstøt/Massespektrometri (EI-MS)

1. MS-instrument: VG Analytical ZAB 2-SE
2. Kildetemperatur: 200°C
3. Elektronspenning: 70 eV
4. Prøveprobe: fast probe
5. Probetemperatur: 280°C

b. Væskekromatografi/Massespektrometri (LC-MS)

1. Binær pumpe HP1100 med vakuum-avgassings-innretning
2. Løsningsmiddel A: vann:ACN (88:12) på volumbasis, inneholdende 0,1% TEA
3. Løsningsmiddel B: vann:ACN (1:1) på volumbasis, inneholdende 0,1% TEA
4. Gradient: 0% løsningsmiddel B økt til 30% løsningsmiddel B på 18 minutter; økt til 100% løsningsmiddel B etter 27 minutter, hold i 3 minutter
5. Strømningshastighet: 1,5 ml pr. minutt
6. Kolonne: Water Symmetri C_{18}-kolonne 4,6 mm x 250 mm, 5 μm)
7. Kolonnetemperatur: 40°C
8. Detektor: Variabel bølgelengde UV, 290 nm
9. MS-Instrument: VG Bio-Q trippel-dobbeltdipol-massespektrometer
10. Operasjonsmodus: Positiv elektrospray-ioniserings-(+ESI)-modus
11. Kildetemperatur: 80°C

c. Hurtig-atombombardement (FAB-MS)

1. MS-Instrument: VG Analytisk ZAB 2-SE
2. Prøveinnføring: Cesiumion-pistol
3. Datasystem: VH Analytical 11-250J med PDP 11/73

d. Elektrospray-massespektrometer (ESI-MS)
   1. MS-Instrument: VG Biotech Bio-Q med dobbelt-dipol-analysator
   2. Operasjonsmodus: negativt ion direkte infusjon
   3. Injeksjonsvolum: 50-75 µl
   4. Elueringsløsningsmiddel: 50% vandig ACN inneholdende 0,1% FA
   5. Strømningshastighet: 10 µl pr. minutt

e. Elektrospray MS/MS (ESI-MS/MS)
   1. MS-Instrument: VG Quattro II Bio-Q trippel-dobbeltdipol-analysator
   2. Kollisjonsgass: argon
   3. Prøveporsjon: 50-75 µl
   4. Elueringsløsningsmiddel: 50% vandig ACN inneholdende 0,1% TFA
   5. Strømningshastighet: 10 µl pr. minutt

f. Høyoppløsnings-massespektrometer (HR-MS)
   1. MS-Instrument: VG Analytical ZAB 2-SE
   2. Prøveinnføring: Cesiumion-pistol
   3. Datasystem: VH Analytical 11-250J med PDP 11/73

4. Kjernemagnetisk resonans-spektrometri (NMR)
   a. 400 MHz Varian Inova NMR

5. Røntgendiffraksjons-enkeltkrystallanalyser
   a. Automatisk enkeltkrystall-diffraktometer av typen Nonius CAD4, modell 586
   b. Cu-røntgenrør, fin fokus, (λ=1,5418 Å)
   c. Tilfeldig orientering fotografisk tilknytning, Polaroid, modell 57-3
   d. Dataoppsamlingsprogram av typen EXPRESS
   e. Datatolkningsprogram av typen MOLEN

B. Kjemikalie, reagens og standarder

1. Kjemikalier og reagenser
   a. Acetonitril (ACN), HPLC-kvalitet
   b. Metanol (MeOH), HPLC-kvalitet
   c. Kloroform ($CHCl_3$), HPLC-kvalitet
   d. Iseddik (GAA), ACS-kvalitet
   e. Saltsyre (HCl), ACS-kvalitet
   f. Milli-Q-vann
   g. Trietylamin (TEA), HPLC-kvalitet
   h. Ammoniumacetat, AR-kvalitet
   i. Natriumhydroksid-(NaOH)-pellets, reagenskvalitet
   j. Nitrogengass, null-kvalitet
   k. Metanol, deuterert (d_4-MeOH)
   l. Dimetylsulfoksid, deuterert (d_6-DMSO)
   m. Vann, deuterert (D_2O)
   n. Saltsyre, deuterert (DCl)
   o. Natriumtetrafenylborat, reagenskvalitet

Innledende preparativt HPLC-system 2 for fraksjonsopsamling av forbindelser

Innledende fraksjonsoppsamling

Vandig fortynningsmiddel - Tillag en oppløsning av 0,1 M eddiksyre og juster pH til 6,1 ± 0,1 med NaOH.

Mobil fase A - 88:12 Vandig fortynningsmiddel : ACN

Mobil fase B - 50:50 Vandig fortynningsmiddel : ACN

Prøvetillaging: Tillag en 15 mg/ml oppløsning av det tørkede, blandede kompleks-reaksjonsprodukt i vandig fortynningsmiddel. Sett oppløsningen i 30-40 ml porsjoner på atskilte 10 g C_{18}-SPE-patroner, vask med ca. 20 ml vandig fortynningsmiddel og vask så med ca. 10 ml vann. Eluer med ca. 10 ml 0,01 N

HCl i MeOH. Rotasjonsfordamp den rensede prøve til tørrhet og oppløs på nytt i vandig fortynningsmiddel.

Kromatografisk system: Et AP 1100 HPLC-system med kolonne-oppvarmingsinnretning utstyres med en 7 µm, 30,0 cm x 7,8 mm C_{18}-kolonne og en egnet UV-detektor for påvisning ved 290 nm og dioderekke, strømnings-hastigheten innstilles til 5,0 ml pr. minutt og kolonnetemperaturen til 20°C. Følgende gradienteluering anvendes:

	% Mobil fase	
Tid (min.)	A	B
0	80	20
15	60	40
15,1	0	100
25	0	100
25,1	80	20

Fremgangsmåte: 900 µl porsjoner av prøven injiseres på det kromatografiske system, og de aktuelle topper oppsamles ved anvendelse av en multikanals-fraksjonskollektor. Når alle fraksjonene er oppsamlet, blir hver fraksjon rotasjonsfordampet under fjerning av størstedelen av ACN, deretter konsentrert på en C_{18}-SPE-patron, vasket med vann og eluert med ca. 5 ml 0,01 N HCl i MeOH. Rotasjonsfordamp det eluerte materiale til tørrhet og sett tilside for ytterligere rensing.

Endelig fraksjonsoppsamling

Mobil fase A - 88:12 0,1% TEA : ACN

Mobil fase B - 50:50 0,1% TEA : ACN

Prøvetillaging: Tillag en oppløsning av de tørkede fraksjoner fra den innledende fraksjonsoppsamling og fortynn med mobil fase A.

Kromatografisk system: Et HP1100 HPLC-system med kolonne-oppvarmingsinnretning utstyres med en 7 µm, 30,0 cm x 7,8 mm C_{18}-kolonne og en egnet UV-detektor for påvisning ved 290 nm og dioderekke, strømnings-hastigheten innstilles til 5,0 ml pr. minutt og kolonnetemperaturen til 30°C. Følgende gradienteluering anvendes:

	% Mobil fase	
Tid (min.)	A	B
0	73	27
8	70,6	29,4
8,1	45	55
9	45	55
16	25,5	74,5
16,1	73	27

Fremgangsmåte: 200 µl porsjoner av prøven injiseres på det kromatografiske system, og de aktuelle topper oppsamles ved anvendelse av en multikanals-fraksjonskollektor. Når alle fraksjonene er oppsamlet, blir hver fraksjon innledningsvis rotasjonsfordampet under fjerning av størstedelen av ACN, deretter konsentrert på en C_{18}-SPE-patron, vasket med vann og eluert med ca. 5 ml 0,01 N HCl i MeOH. Fraksjonene blir så brakt til tørrhet under en strøm av tørr nitrogengass og satt tilside for utførelse av analyser for identifisering.

Karakterisering av forbindelse IV

Separering og isolering

Forbindelse IV isoleres ved anvendelse av en semipreparativ HPLC-metode. Fraksjonen oppsamles, størstedelen av ACN fjernes ved hjelp av

rotasjonfordamping og fraksjonen konsentreres ytterligere ved anvendelse av en C_{18}-SPE-patron, vaskes med vann og elueres med ca. 5 ml 0,01 N HCl i MeOH. Fraksjon blir så brakt til tørrhet under en strøm av tørr nitrogen. En del av materialet oppløses på nytt i en mobil fase og injiseres i HPLC-systemet for bestemmelse av renheten av fraksjonen. Denne injeksjon av forbindelse IV viser en renhet på ca. 95%, og 8,2 mg testes ved hjelp av NMR.

Massespektralanalyser

Foreløpige LC-MS-massespektraldata for det malte, blandede kompleks-reaksjonsprodukt viser at molekylvekten for forbindelse IV er ca. 375,3 m/z. Ytterligere HR-MS-undersøkelser med anvendelse av fraksjoner oppsamlet fra LC-MS viser en masse på 375,1655 m/z og molekylformelen $C_{22}H_{23}N_4S_1$ for forbindelse IV. «Døtrene» av moder-ionet på 375 m/z av forbindelse IV undersøkes under anvendelse av positiv ESI-MS/MS. Fragmenteringsmønstret viser at de dominerende tap av 16 amu og 44 amu fra molekyl-ionet av forbindelse IV viser strukturen av forbindelse IV. Denne forbindelse og dens N- og N,N-dimetylerte derivater, forbindelse V og VI, dannes ved en sekundær reaksjon mellom moderforbindelsen (TBO) og overskuddet av utgangsmaterialet o-toluidin.

Karakterisering av forbindelse I

Separering og isolering

Forbindelse I isoleres ved anvendelse av den semipreparative HPLC-metode. Fraksjonen oppsamles, størstedelen av ACN fjernes ved rotasjons-fordampning og fraksjonen konsentreres videre ved anvendelse av en C_{18}-SPE-patron, vaskes med vann og elueres med ca. 5 ml 0,01 N HCl i MeOH. Fraksjonen blir så brakt til tørrhet under en strøm av tørr nitrogen. En del av materialet oppløses på nytt i mobil fase og injiseres på HPLC-systemet for bestemmelse av renheten av fraksjonen. Denne injeksjon av forbindelse I viser en renhet på ca. 95%, og 18,9 mg testes ved hjelp av NMR.

Massespektralanalyse

Foreløpige LC-MS-massespektraldata for det tørkede, blandede komplekse reaksjonsprodukt viser at molekylvekten for forbindelse I er ca. 284,1 m/z. Ytterligere HR-MS-undersøkelser med anvendelse av fraksjoner oppsamlet fra LC-MS viser en masse på 284,1223 m/z og molekylformelen $C_{16}H_{18}N_3S_1$ for forbindelse I. «Døtrene» av moder-ionet på 284 m/z av forbindelse I undersøkes under anvendelse av positiv ESI-MS/MS. Den foreslåtte struktur og fragmenteringsmønster som viser dominerende tap av 16 amu, 30 amu og 59 amu fra molekyl-ionet, gir strukturen av forbindelse I. Forbindelse I og dens N- og N,N-dimetylerte derivater, forbindelser II og II dannes ved en fri-radikal-fjerning av en metylgruppe fra et annet demetylert molekyl på den tilsvarende moder-TBO-isomer.

Forbindelser II, III, V og VI isoleres og karakteriseres ved hjelp av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor for isolering og karakterisering av forbindelser VI og I.

EKSEMPEL 2

Protokoll for klinisk testing

Tillaging av oppløsninger for kliniske tester

Dette eksempel illustrerer anvendelse av hvert av produktene ifølge eksempel 1 ved identifisering av oral dysplasi.

Forbindelse I, bringebær-smaksstoff (IFF Raspberry IC563457), natriumacetat-trihydrat-bufringsmiddel og H_2O_2-(30% USP)-konserveringsmiddel (se US-patent nr. 5 372 801) oppløses i renset vann (USP), iseddik og SD 18 etylalkohol, under fremstilling av en testoppløsning med sammensetningen angitt i tabell A.

TABELL A

Komponent	Vekt%
Forbindelse I	1,00
Smaksstoff	0,20
Bufringsmiddel	2,45
Konserveringsmiddel	0,41
Eddiksyre	4,61
Etylalkohol	7,48
Vann	83,85
	100,00

Før-skyllings- og etter-skyllings-testoppløsninger av 1 vekt% eddiksyre i renset vann, natriumbenzoat-konserveringsmiddel og bringebærsmaksstoff tillages.

Klinisk protokoll

Pasienten tildekkes med en smekke for å beskytte klærne. Det ventes ekspektorering, slik at pasienten utstyres med en kopp på 0,3 l, som kan kastes i en beholder for infeksiøst avfall, eller hvis innhold kan helles direkte i sentrum av en vask, for unngåelse av farging av vasken. Omgivende overflater eller gjenstander som kan farges, tildekkes eller fjernes fra testområdet.

Det utføres en visuell munnkreftundersøkelse uten anvendelse av noen instrumenter som vil kunne forårsake hakk eller skjæring i bløtvev. Det gjøres notater om før-fargings-utseendet av bløtvev og tenner.

Pasienten skyller munnhulen med ca. 15 ml av før-skyllings-oppløsningen i ca. 20 sekunder og ekspektorerer under fjerning av overskudd av spytt og tilveiebringelse av et homogent miljø i munnen. Dette trinn blir så gjentatt med ytterligere før-skyllings-oppløsning.

Pasienten skyller så og gurgler med vann i 20 sekunder og ekspektorerer.

Pasienten skyller så og gurgler med 30 ml av testoppløsningen i 1 minutt, og ekspektorerer.

Pasienten skyller så med 15 ml av etter-skyllings-oppløsningen i 20 sekunder, og ekspektorerer. Dette trinn blir så gjentatt.

Pasienten skyller så og gurgler med vann i 20 sekunder og ekspektorerer. Dette trinn blir så gjentatt.

Observasjoner av munnhulen blir så utført under anvendelse av passende bløtvevsundersøkelsesteknikker, innbefattende retraksjon, godt balansert belysning og forstørrelse, hvis nødvendig. Lokalisasjonen, størrelsen, morfologien, fargen og overflatekarakteristikaene for mistenkte lesjoner, som har beholdt blå farge, utføres og registreres.

For å redusere falske positive resultater kommer pasienten tilbake etter 10-14 dager for gjentakelse av ovennevnte protokoll. Dette tidsrom gir tid for heling av eventuell ulcerøs eller traumatisk lesjon eller irritasjonsetiologi på tidspunktet for den første undersøkelse. Positiv farge etter den andre undersøkelse av et mistenkt område påvist ved den første undersøkelse anses som en indikasjon på kreftvev eller precancerøst vev, og det tas en biopsi for å bekrefte denne konklusjon.

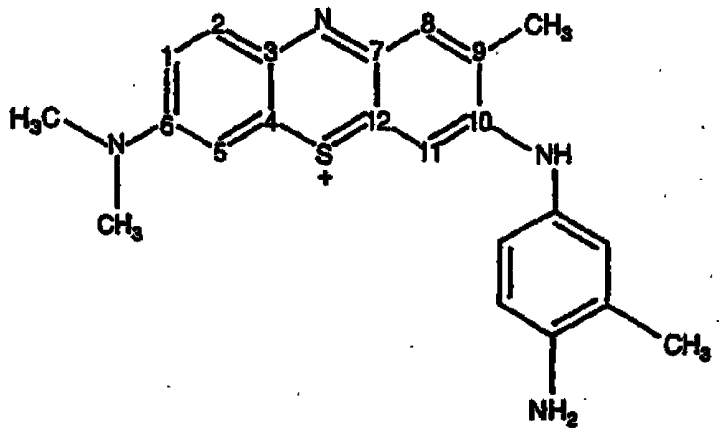
Tidlige erytroplastiske lesjoner farger blått, ofte i et stiplet eller flekket mønster. Det er imidlertid normalt at fargen holdes tilbake av de uregelmessige papillesprekker på tungeryggen, noe som ikke er en positiv indikasjon. Andre områder som holder tilbake blå farge, men som ikke anses som positive, innbefatter detale plakk, tannkjøttrender ved hver tann, diffus farge på den bløte gane på grunn av farge som er overført fra den tilbakeholdte farge på tungeryggen, samt ulcerøse lesjoner som lett kan skjelnes. I alle tilfeller hvor man sterkt mistenker en lesjon, men som ikke farger positivt med denne test, er det ikke desto mindre viktig at det tas en biopsi.

EKSEMPLER 3-7

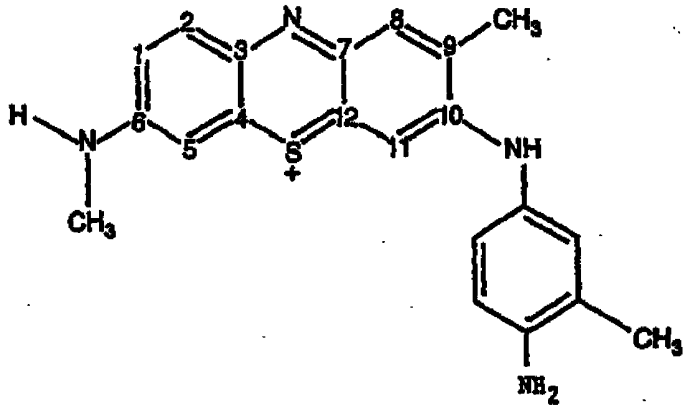
Fremgangsmåtene beskrevet ovenfor gjentas, bortsett fra at forbindelsene II, III, IV, V og VI anvendes i stedet for forbindelse I. Det oppnås liknende resultater.

PATENTKRAV

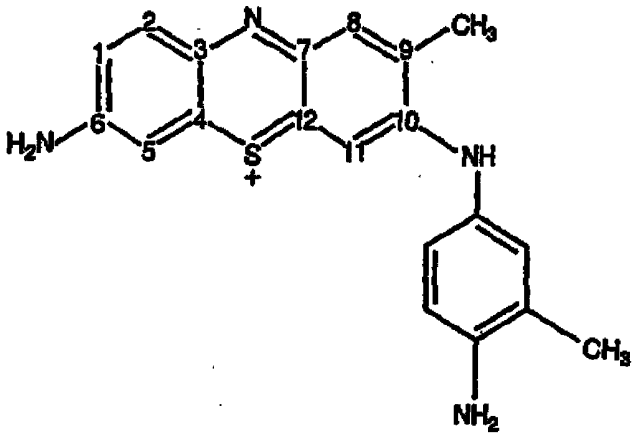
1. Forbindelse, k a r a k t e r i s e r t v e d a t den har strukturformelen



2. Forbindelse, k a r a k t e r i s e r t v e d a t den har strukturformelen



3. Forbindelse, k a r a k t e r i s e r t v e d a t den har strukturformelen



4. Anvendelse av en forbindelse ifølge et hvilket som helst foregående krav for fremstilling av en sammensetning for identifisering av dysplastiske vev ved selektiv farging av dysplastisk vev.

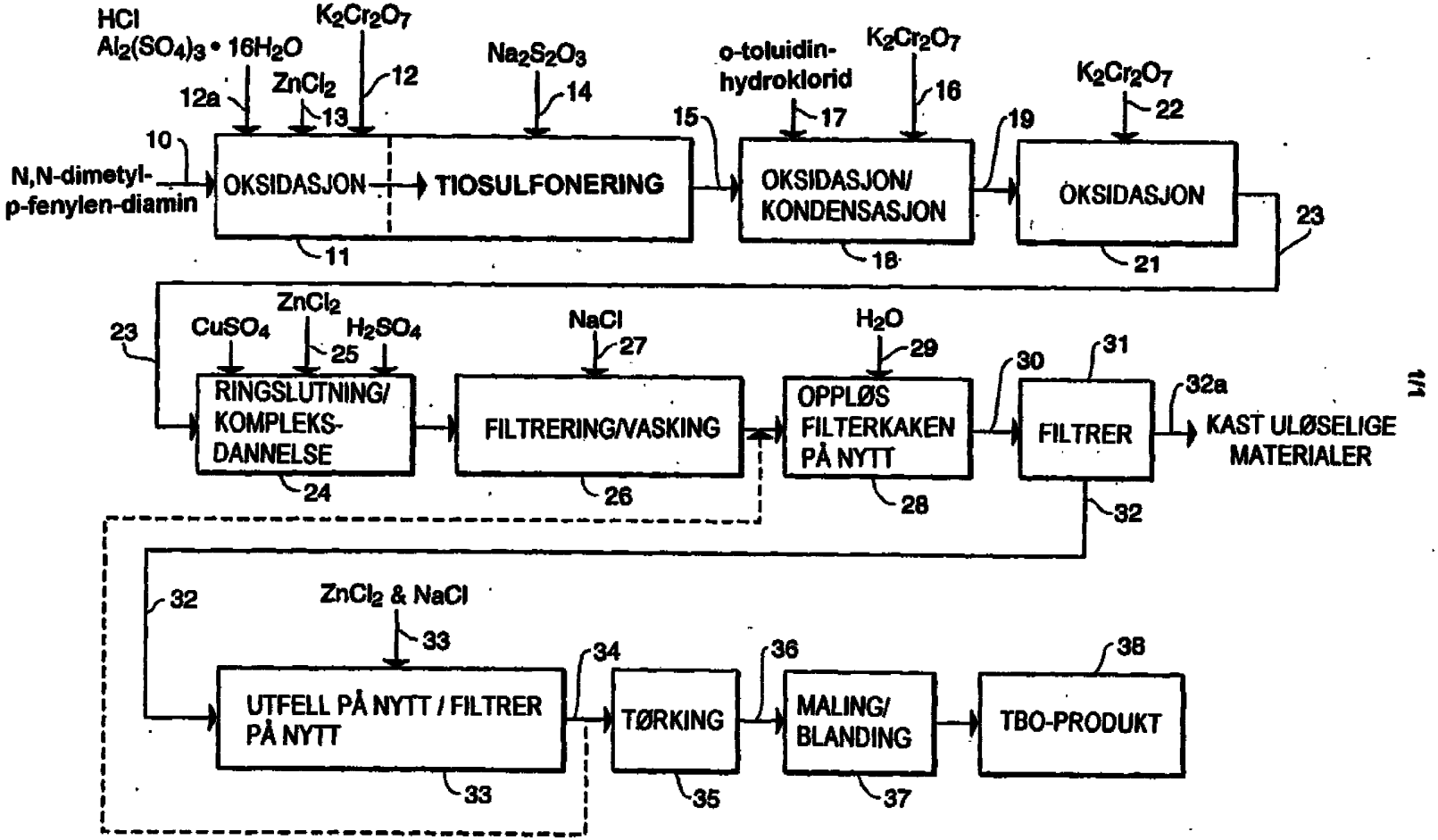

HCl
$Al_2(SO_4)_3 \cdot 16H_2O$
$K_2Cr_2O_7$
12a
$ZnCl_2$
13
12
$Na_2S_2O_3$
14
o-toluidin-hydroklorid
$K_2Cr_2O_7$
16
17
$K_2Cr_2O_7$
22
10
15
19
N,N-dimetyl-p-fenylen-diamin
OKSIDASJON
TIOSULFONERING
OKSIDASJON/ KONDENSASJON
OKSIDASJON
23
11
18
21
23
$ZnCl_2$
$CuSO_4$
H_2SO_4
25
NaCl
27
H_2O
29
30
31
32a
RINGSLUTNING/ KOMPLEKS-DANNELSE
FILTRERING/VASKING
OPPLØS FILTERKAKEN PÅ NYTT
FILTRER
KAST ULØSELIGE MATERIALER
24
26
28
32
32
$ZnCl_2$ & NaCl
33
34
36
38
UTFELL PÅ NYTT / FILTRER PÅ NYTT
TØRKING
MALING/ BLANDING
TBO-PRODUKT
33
35
37

FIG. 1